

ELISABETH KELLERWESSEL

ENDOTHEL- UND MYOKARDFUNKTION ISOLIERTER
RATTENHERZEN NACH EINER KURZZEITISCHÄMIE
UND DEREN BEEINFLUSSUNG DURCH
SUPEROXIDDISMUTASE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Experimentelle Medizin der Universität zu Köln

Betreuer: Prof. Dr. Thomas Minor

Eingereicht über das Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Kleintiere - Chirurgie

- der Justus-Liebig-Universität Gießen

Im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. Klaus H. Bonath

Endothel- und Myokardfunktion isolierter Rattenherzen nach einer Kurzzeitschämie und deren Beeinflussung durch Superoxiddismutase

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Elisabeth Kellerwessel

Tierärztin aus Köln

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Minor

Prof. Dr. Klaus H. Bonath

Tag der Disputation: 12.02.2009

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Myokardiale Energieversorgung.....	3
2.2	Funktionen des Endothels und Auswirkungen einer Ischämie auf das Endothel.....	4
2.3	Die Rolle freier Radikale bei Ischämie und Reperfusion	6
2.4	Zum Modell des isoliert perfundierten Herzens	9
3	MATERIAL UND METHODIK.....	11
3.1	Versuchstiere.....	11
3.1.1	Herkunft und Haltungsbedingungen	11
3.1.2	Einteilung der Versuchsgruppen	11
3.2	Aufbau und Betrieb der Perfusionsapparatur	12
3.3	Herzentnahme.....	16
3.3.1	Anästhesie, Tracheotomie und kontrollierte Beatmung	16
3.3.2	Thorakotomie und Vorbereitung zur Herzentnahme	17
3.3.3	Herzentnahme	17
3.4	Vorbereitung der isolierten Herzen für Messungen und Perfusion.....	18
3.5	Messungen an den isolierten Herzen	19
3.5.1	Koronarer Fluss	19
3.5.2	Linksventrikulärer Druck und abgeleitete Größen	19
3.6	Perfusionslösungen	20
3.7	Medikationen	21
3.8	Versuchsablauf.....	22
3.8.1	Perfusionsphase.....	22
3.8.2	Ischämie	23
3.8.3	Reperfusionsphase.....	24
3.8.3.1	In situ-Herzen	25
3.8.3.2	Perfusionsherzen	25

3.8.4	Übernommene Versuche.....	25
3.9	Beendigung des Versuchs mittels Gefrierstopp	26
3.10	Präparation des Ventrikelgewebes zur analytischen Aufarbeitung	26
3.11	Gefrier- und Hitzetrocknung des Ventrikelgewebes	27
3.12	Gewebsextraktion und Analyse des Stoffwechselstatus	27
3.13	Statistische Methoden	28
4	ERGEBNISSE	30
4.1	Körpergewicht	30
4.2	Ventrikelgewicht.....	30
4.3	Temperatur.....	30
4.4	Koronarfluss	30
4.4.1	Veränderungen in beiden Gesamtgruppen (Kontrolle und SOD)	30
4.4.2	Koronarfluss-Differenzen bei den Einzelversuchen in der Kontroll- und SOD-Gruppe	33
4.5	Herzmechanik.....	35
4.5.1	Maximaler linksventrikulärer Druck (LVD max)	35
4.5.2	Maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (+dp/dpmax)	37
4.5.3	Maximale linksventrikuläre Druckabfallgeschwindigkeit (-dp/dtmax).....	39
4.6	Graphische Darstellung des linksventrikulären Drucks.....	41
4.7	Linksventrikulärer Stoffwechselstatus	44
5	DISKUSSION	47
5.1	Methodik.....	47
5.2	Myokardiale Wirkungen von Acetylcholin und Papaverin am präischämischen Herzen.....	50
5.3	Auswirkungen von Acetylcholin und Papaverin während der Reperfusion bei Herzen mit und ohne Superoxiddismutase-Behandlung	52
5.4	Herzmechanik	56
5.5	Stoffwechselparameter	58
5.6	Schlussfolgerungen.....	60
6	ZUSAMMENFASSUNG	61

7	SUMMARY	65
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	67
9	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	78
10	DANKSAGUNG	80

1 Einleitung und Fragestellung

Eine Ischämie und Reperfusion ischämischer Gewebe kommt im Kreislaufsystem bei Koronarspasmen in Form transitorischer Gefäßverschlüsse, in der Transplantationsmedizin, in der Herz- und Gefäßchirurgie und in der Thrombolysetherapie vor. Die Reperfusion ist zwar unabdingbar für das postischämische Überleben der Gewebe, sie kann aber ihrerseits Nebenwirkungen induzieren, die zu einer weiteren Schädigung führen (HEARSE et al. 1977; BRAUNWALD und KLONER 1985; FOX et al. 1985; BECKER und AMBROSIO 1987; HUGENHOLTZ 1988). Das Auftreten dieser so genannten Reperfusionsschäden ist für viele Organe beschrieben worden. Am Herzen gehören dazu das verstärkte Auftreten von Arrhythmien, die vorübergehende reversible Verminderung der mechanischen Herzfunktion („Stunning-Phänomen“) und vaskuläre Funktionsstörungen (HEARSE et al. 1977; CROSS 1987; ASIMAKIS et al. 2002).

Die Folgen einer Ischämie auf die Myokardzellen sind seit langem bekannt (KÜBLER und SPIECKERMANN 1970; BRETSCHNEIDER et al. 1975; LEVITSKY und FEINBERG 1975). Den Auswirkungen der Ischämie auf die Koronararterien wurde dagegen weniger Aufmerksamkeit gewidmet und diese zunächst mit der glatten Muskulatur der Gefäße in Zusammenhang gebracht. Es wurde allerdings festgestellt, dass auch Endothelzellen eine entscheidende Rolle beim Entstehen der Folgeschäden einer Ischämie und Reperfusion spielen (KU 1982; VAN BENTHUYSEN et al. 1987; TSAO et al. 1990; GROSS et al. 1992; LAUDE et al. 2001). Hierbei kommt der massiven Freisetzung freier Radikale, der „reactive oxygen species“ (ROS), besondere Bedeutung zu (GROSS et al. 1992; LAUDE et al. 2001).

Die Meinungen über die Bedeutung und die zeitliche Abfolge der Endothel- beziehungsweise Myokardschäden sind nicht übereinstimmend und nur wenige Untersuchungen des Endothels sind bisher am ganzen Herzen durchgeführt worden. Von der ischämischen Endothelreaktion am komplett isolierten Rattenherzen liegen noch keine Ergebnisse vor.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung an isoliert perfundierten Rattenherzen sollen vor der Ischämie Acetylcholin und Papaverin injiziert und die Reaktion der Gefäße überprüft werden. Anhand der Untersuchungen am isolierten Herzen können anderweitig produzierte vasoaktive Substanzen, die eventuell die Gefäßreaktionen beeinflussen,

ausgeschlossen werden. Durch Applikation des Radikalfängers Superoxiddismutase soll eine Aussage darüber möglich sein, ob die eventuell beobachteten Schäden mit der Bildung freier Radikale in Zusammenhang gebracht und ob diese durch den Radikalfänger verhindert oder reduziert werden können.

Sowohl nach Acetylcholin- (neurotroper endothelabhängiger Gefäßdilator) als auch nach Papaveringabe (myotroper endothelunabhängiger Vasodilator) wird als Reaktion ein vermehrter Koronarfluss erwartet. Eine weitere Acetylcholin- und Papaverinapplikation soll an einem Teil der Tiere durch eine Superoxiddismutase-Gabe ergänzt werden. Wird durch die Ischämie eine ROS-vermittelte Endothelschädigung verursacht, dann wird der Koronarfluss in der nicht mit Superoxiddismutase behandelten Kontrollgruppe im Vergleich zur SOD-behandelten Gruppe nicht oder nur wenig erhöht sein. Dies würde aber gleichzeitig auch bedeuten, dass diese Schädigung durch freie Sauerstoffradikale verursacht worden ist, weil sie mit Radikalfängern aufgehoben oder vermindert werden kann.

Zusammenfassend sollen mit der Untersuchung folgende Fragen beantwortet werden:

- Sind nach einer kurzzeitigen Ischämie Endothelschäden nachweisbar?
- Können diese durch eine Gabe von Superoxiddismutase gemindert werden?

2 Literaturübersicht

2.1 Myokardiale Energieversorgung

Bereits vor über 50 Jahren wurde erkannt, dass die für die Aufrechterhaltung der Herzmuskelfunktionen notwendige Energie vom aeroben Stoffwechsel bereitgestellt wird (BRETSCHNEIDER 1964; ISSELHARD 1965; KÜBLER und SPIECKERMANN 1970). Die Hauptenergiequelle des Herzmuskels stellt mit 70% die β -Oxidation von Fettsäuren dar. Der verbleibende Energiebedarf wird durch die Substrate Laktat, Ketonkörper und Aminosäuren, in geringerem Maße auch durch Glykogen und Triglyzeride gedeckt. Unter physiologischen Bedingungen wird Glukose durch die aerobe Glykolyse, den Zitratzyklus und die Atmungskette vollständig zu H_2O und CO_2 abgebaut. Der Energiegewinn pro Mol abgebauter Glukose beträgt 36 bis 38 Mol ATP (TAEGTMEYER 1994; LÖFFLER und PETRIDIS 2003).

Sinkt der intrazelluläre Sauerstoffpartialdruck unter ca. 5 mm Hg – etwa bei einem Herzinfarkt oder iatrogen im Rahmen einer Herzoperation – verläuft der Stoffwechsel anaerob. Der Fettsäureabbau als Hauptenergiequelle des Herzmuskels kommt nun zum Erliegen. Das Überleben der Muskelzellen kann nun nur durch die Möglichkeit der anaeroben Glykolyse gewährleistet werden. Hierbei wird Glukose zu Laktat abgebaut. Der Energiegewinn aus einem Mol Glukose ist auf 2 Mol ATP reduziert (LÖFFLER und PETRIDIS 2003).

Der kritische zelluläre ATP-Gehalt, unterhalb dessen eine Wiederbelebung des Herzens praktisch nicht mehr möglich ist, wurde von Bretschneider als Index für die Myokardprotektion gewählt (BRETSCHNEIDER et al. 1975) und am Rattenmyokard ein kritischer Gehalt von 10-12 $\mu\text{mol/g}$ TG ermittelt. Auch für die zum „stone heart“ führende Unfähigkeit der Zelle, die Kalzium-Homöostase aufrecht zu erhalten, wird eine Unterschreitung des kritischen ATP-Wertes in der Zelle verantwortlich gemacht (HEARSE et al. 1977).

2.2 Funktionen des Endothels und Auswirkungen einer Ischämie auf das Endothel

Während das Endothel zunächst nur als eine inerte Wandauskleidung von Gefäßen mit antithrombotischen und semipermeablen Eigenschaften galt, weiss man heute, dass Endothelzellen eine Fülle verschiedener Stoffe wie beispielsweise Prostacyclin (PGI₂), Endothelin, Platelet Activating Factor (PAF), Adenosin und zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) synthetisieren können (GERLACH et al. 1985; SCHRÖR 1985).

Die endothelialen Funktionen fassen Mügge u. Mitarb. wie folgt zusammen (MÜGGE et al. 1989):

- Sitz verschiedener Enzyme auf der dem Lumen zugewandten Seite,
- Hauptbildungsort für vasoaktive Prostaglandine,
- Entstehungsort des endothelialen relaxierenden Faktors (EDRF),
- Entstehungsort endothelialer, konstriktorisch wirksamer Faktoren,
- Entstehungsort von Faktoren, welche die Thrombozytenaggregation hemmen und antikoagulatorisch wirken, aber auch von solchen, die die plasmatische Gerinnung fördern.
- Regulation der Physiologie und Pathophysiologie der Gefäße.

Unter bestimmten Versuchsbedingungen können auch vasokonstriktorische Faktoren von Endothelzellen gebildet beziehungsweise nachgewiesen werden. Mitte der 1980er Jahre wurde erstmals ein von kultivierten Endothelzellen gebildeter vasokonstriktorisches Faktor beschrieben (HICKEY et al. 1985). Yanagisawa et. al. gelang 1988 die Isolierung dieses Faktors aus kultivierten porcinen Endothelzellen (YANIGASAWA et al. 1988), der fortan als Endothelin bezeichnet wurde. Nach der Identifizierung des Endothelins als Peptid wurden zwei weitere, strukturell verwandte Peptide identifiziert, die sich in zwei beziehungsweise sechs Aminosäuren unterscheiden (INOUE et al. 1989). Das Endothelin-System scheint – neben anderen Funktionen – auch direkte Wirkungen auf den Herzmuskel auszuüben. So wird am insuffizienten Herzmuskel sowohl im

Tiermodell als auch an humanen Präparaten eine Aktivierung des Endothelin-Systems in Form einer erhöhten Expression von Endothelin-Rezeptoren beobachtet (TONNESSEN et al. 1997). Dies dürfte die Ausbildung einer kardialen Hypertrophie sowie das strukturelle Remodelling der Herzwand begünstigen (MULDER et al. 1997).

Lichtmikroskopisch bildet das Endothel einen hauchdünnen, einschichtigen Zellbelag an der inneren Oberfläche der Intima. Ein Defekt im Endothelverband ist das entscheidende *primum movens* und führt zum Freilegen des subendothelialen Gewebes. Bei schonender Technik der Endothelentfernung mit einem sehr zarten Nylonkatheter werden in der Rattenaorta strichförmige Defekte mit einer Breite von 10-15 Endothelzellen innerhalb von drei Tagen wieder mit Endothel bedeckt. Bei einem 90-120 Zellen breiten Defekt dauert die Reendothelisierung dagegen sieben bis acht Tage. Dabei fehlt noch eine signifikante Vermehrung glatter Muskelzellen. An der Kaninchenaorta erfolgte die Wiederbedeckung eines fünf bis acht Zellen breiten Endotheldefektes innerhalb von zwei Tagen (REIDY et al. 1983).

Das Endothel hat eine lange Lebensdauer, die alters-, standort- und wohl auch speziesabhängig ist. Die Fähigkeit der Endothelien zur Regeneration scheint begrenzt zu sein. An der Aorta von neugeborenen Ratten fanden Schwartz und Benditt eine tägliche Replikationsrate von 13%, bei 5-6 Monate alten Tieren betrug sie nur noch 0,1-0,3%. Unter pathologischen Bedingungen stieg die Replikationsrate aber auf etwa das Zehnfache an (SCHWARTZ und BENDITT 1973).

Die Untersuchung der Rolle des Endothels bei Ischämieschäden war erst nach der Entdeckung von Furchgott und Zawadzki möglich, die erstmalig im Jahr 1980 nachwiesen, dass die relaxierende Wirkung von Acetylcholin an isolierten aortalen Gefäßstreifen des Kaninchens von der Anwesenheit eines intakten Endothels abhängt (FURCHGOTT und ZAWADZKI 1980).

In einer Vielzahl von Arbeiten wurde festgestellt, dass die ischämiebedingte Gewebeschädigung unter anderem auch durch einen ATP-Verlust gekennzeichnet ist (THOM et al. 1955; ISSELHARD 1960; BRETSCHNEIDER 1964; FLECKENSTEIN et al.

1976). Das Ausmaß dieser Verminderung ist abhängig von der Dauer der Ischämie und der Belastung des Herzens während der Ischämie. Aus Befunden, wie früh beginnendem Ödem, Schwellungen und Verzerrungen von Mitochondrien, Deformationen der Myofibrillen, Glycogenaufösungen und Matrixverdichtungen, schließt man, dass die Schädigungen durch transmembranöse Kalziumflüsse größeren Ausmaßes hervorgerufen werden können (FLECKENSTEIN et al. 1967). Somit wären sowohl der Ischämie- als auch der Reperfusionsschaden ganz wesentlich auf die Unfähigkeit der Zelle zurückzuführen, die Calcium-Hömoostase aufrechtzuerhalten.

2.3 Die Rolle freier Radikale bei Ischämie und Reperfusion

Radikale sind Atome, Moleküle oder Ionen mit einem oder mehreren ungepaarten („freien“) Elektronen. Bedingt durch diese Elektronenkonfiguration weisen Radikale eine hohe chemische Reaktivität auf. Die wichtigsten freien Sauerstoff-Radikale „reactive oxygen species (ROS)“ sind das Superoxid-Radikal und das Hydroxyl-Radikal sowie der Singulett-Sauerstoff als aktiver molekularer Sauerstoff (JESBERGER und RICHARDSON 1991; JAESCHKE 1995; FINKEL und HOLBROOK 2000).

Aus etwa 5% des Sauerstoffs entsteht in den Mitochondrien durch Aufnahme von einem Elektron das Superoxid-Radikal:



(Der Punkt symbolisiert das freie Elektron)

Daraus kann durch weitere Elektronenaufnahme Hydrogenperoxid entstehen. Diese Umwandlung ist eine Dismutation; das so entstandene H_2O_2 ist kein Radikal mehr. Die Reaktion wird durch die in den Endothelzellen vorhandene Superoxiddismutase (SOD) beschleunigt, wobei das Enzym eine Schutzfunktion ausübt, da aus dem sehr reaktiven und gewebstoxisch wirkenden Superoxid-Radikal das weniger toxische Hydrogenperoxid (H_2O_2) entsteht. Dessen weiterer Abbau zu Wasser wird durch die Enzyme Katalase und Glutathion-Peroxidase beschleunigt, die ihrerseits auch eine Schutzfunktion ausüben (JAESCHKE 1995). Eine weitere Umwandlungsmöglichkeit von H_2O_2 wird durch die Entstehung vom Hydroxyl-Radikal ($\cdot\text{OH}$) entweder durch das Superoxid-

Radikal oder durch Katalyse von Metallionen (meistens Kupfer oder Eisen) erreicht. Beim Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) ändert sich das Spinnmoment bei einem der zwei Elektronen (STOHS und BAGCHI 1995).

Der destruktive Charakter der Sauerstoffradikale liegt unter anderem in ihrer Reaktion mit ungesättigten Fettsäuren unter Beteiligung von Metallionen wie Cu^{++} , Fe^{++} begründet. Es entstehen Lipidradikale, die in Anwesenheit von O_2 zu Lipidperoxiden reagieren. Diese bilden ihrerseits aus ungesättigten Fettsäuren erneut Lipidradikale, so dass eine Kettenreaktion entsteht (JESBERGER und RICHARDSON 1991; PHILLIS 1994; BONGARZONE et al. 1995; JAESCHKE 1995; FINKEL und HOLBROOK 2000).

Für die Zelle bedeutet dieser Vorgang eine Schädigung der Membranstruktur und -funktion. Dabei können sowohl die Integrität der äußeren Zellmembran als auch einzelne Kompartimente in der Zelle alteriert werden, was unter Umständen zu einer vermehrten Membranpermeabilität oder gar zum Zelltod führen kann (HOCKENBERY et al. 1993; BREDENSEN 1995; JACOBSEN 1996).

Im nicht ischämischen Myokard besteht ein Gleichgewicht zwischen dem Entstehen freier Sauerstoffradikale und endogener freier Radikalfänger wie beispielsweise in Erythrozyten Katalase und Glutathionperoxidase. Die Akkumulation der anaeroben metabolischen Spaltprodukte energiereicher Phosphate führt bei gleichzeitiger Erhöhung der zytosolischen Kalziumionenkonzentration zur Umwandlung der Xanthindehydrogenase in Xanthinoxidase, die die Bildung von Superoxidionen beziehungsweise Hydroxylionen katalysiert. Diese freien Radikale bewirken durch Zerstörung der Phospholipidmembranen der Myokardzelle sowie bestimmter DNS-Strukturen, durch Aktivierung der neutrophilen Granulozyten sowie die Dissoziation von Elektronen in der mitochondrialen Atmungskette die Zerstörung der Herzmuskelzelle, wenn vorher keine Umwandlung in die ungefährlichen Endprodukte Wasser und Sauerstoff im erythrozytären Glutathionredoxkreislauf oder durch endogene Katalase erfolgt. Somit gibt es einen direkten Zusammenhang zwischen dem prolongierten Auftreten von freien Radikalen und ultrastruktureller Schädigung des Myokardgewebes mit der Folge der verzögerten Wiedererlangung der vollen kontraktile Funktion (JURMANN et al. 1988).

Freie Sauerstoff-Radikale werden unter physiologischen Bedingungen fortlaufend, nicht nur im Herzen, sondern auch in anderen Organen gebildet. Die normalerweise

vorhandenen endogenen Schutzmechanismen sorgen dafür, dass diese neutralisiert werden. Während der Ischämie und besonders während der Reperfusion wird die Menge der gebildeten freien Sauerstoff-Radikale erhöht, was mit spezifischen Methoden direkt nachweisbar ist (GARLICK et al. 1987; BOLLI et al. 1989; ZWEIER et al. 1994). Durch die erhöhte Membranpermeabilität gehen die Radikalfänger („scavenger“), d. h. beispielsweise die Enzyme Superoxiddismutase, Katalase und Glutathion-Peroxidase für die Zelle verloren (FERRARI et al. 1985) (HALLIWELL und GUTTERIDGE 1990; DAS 2000).

Außer in den Mitochondrien tritt die Produktion von freien Radikalen unter ischämischen Bedingungen beim Abbau von Katecholaminen, bei einer Leukozytenaktivierung und bei der Umwandlung des Enzyms Xanthindehydrogenase in Xanthinoxidase auf (DOWNEY et al. 1986; BINDOLI et al. 1988).

Bei globaler Ischämie des Myokards beziehungsweise bei regionaler Ischämie im Falle des Herzinfarktes kommt es zur Freisetzung von Norepinephrin aus den sympathischen Nervenendigungen. Dessen Abbau durch das Enzym Monoaminoxidase führt zur Produktion von freien Elektronen, die vom molekularen Sauerstoff aufgenommen werden können, wobei freie Radikale entstehen (DOWNEY et al. 1986; BINDOLI et al. 1988).

Bereits vor zwanzig Jahren wurde festgestellt, dass die Entstehung freier Sauerstoff-Radikale nicht nur während der Ischämie selbst zu Myokardschäden führt, sondern dass diese auch und gerade während der Reperfusion beziehungsweise Reoxygenierung des Myokards nach vorausgegangener ischämischer Belastung auftreten und das Myokard erst zu diesem Zeitpunkt schädigen (HALLIWELL 1984; MCCORD 1988). Dabei soll die Zelle durch die ischämische Schädigung bei einem plötzlichen Wiedereintritt der Reoxygenierung nicht in der Lage sein, die anfallenden Sauerstoffradikale in adäquater Weise zu metabolisieren, so dass sich zusätzlich sekundäre, durch die Radikale hervorgerufene Schäden ausbilden können (FRIDOVICH 1978). Bei globaler Ischämie des Myokards beziehungsweise bei regionaler Ischämie im Falle des Herzinfarktes kommt es zur Freisetzung von Norepinephrin aus den sympathischen Nervenendigungen. Der Abbau dieser Katecholamine durch das Enzym Monoaminoxidase führt zur Oxidation und damit zur Produktion von freien Elektronen, die von molekula-

rem Sauerstoff in der oben beschriebenen Weise aufgenommen werden können (DOWNEY et al. 1986).

Dass freie Radikale an Reperfusionsschäden maßgeblich beteiligt sind, kann wie folgt bewiesen werden (PRASAD et al. 1993):

1. Mit Hilfe von sogenannten Radikalfängern können die Schäden vermindert werden.
2. Durch exogene Zufuhr radikalbildender Systeme (beispielsweise Xanthin und Xanthin-Oxidase) gelingt es, gleichartige Schäden hervorzurufen.
3. Das Erscheinen der Peroxidationsprodukte von Lipiden weist indirekt auf Radikalentstehung hin.
4. Antioxidative Maßnahmen erweisen sich vielfach als nützlich.

Die therapeutischen Ansätze, freie Sauerstoffradikale als Mediatoren der oben beschriebenen pathologischen Vorgänge auszuschalten, sind vielfältig. Einer der Hauptansätze besteht in der Applikation von „Radikalfängern“. Zu diesen zählen die zelleigenen protektiven Enzyme wie Superoxiddismutase und Katalase. Auch die Gabe von Allopurinol, einem Xanthin-Oxidasehemmer, zeigte im experimentellen Modell eine Reduzierung der von freien Sauerstoffradikalen hervorgerufenen Zellschädigung (MANNING et al. 1984; WERNS und LUCCHESI 1988).

2.4 Zum Modell des isoliert perfundierten Herzens

Oskar Langendorff entwickelte im Jahr 1895 die Methode, ein isoliertes Herz, bei dem sowohl der Lungen- als auch der Körperkreislauf fehlen, via Koronararterien retrograd über die Aorta zu perfundieren. Diese Methode erlaubt es, funktionelle und metabolische Daten von Säugetierherzen zu erheben. Das isolierte Herz kann in diesem Zusammenhang dazu eingesetzt werden, die Auswirkungen bestimmter pathologischer Situationen wie beispielsweise einer Ischämie zu studieren sowie die Anwendbarkeit therapeutischer Maßnahmen (Medikamente, kardioplegische Lösungen) zu überprüfen. Da durch das Modell der Organisolierung humorale und nervale Faktoren, die im Gesamtorganismus eine wesentliche Rolle spielen, ausgeschaltet werden, ist vor einer

Übertragung der gewonnenen Erkenntnisse allerdings die Überprüfung in einem Ganzkörpermodell erforderlich.

Die Operation zur Isolierung des Rattenherzens erfolgt in einer für das Organ möglichst schonenden Art und Weise. Nach intramuskulärer Anästhesie atmen die Tiere zunächst spontan. Die nachfolgende maschinelle Beatmung noch vor der Thorakotomie wird mit einem Respirator durchgeführt. Einer möglichen Thrombenbildung wird durch die Gabe von Heparin vorgebeugt.

Die Freilegung des Herzens erfolgt sehr vorsichtig, um eine mechanische Schädigung des Organs zu vermeiden. Im Anschluss an die Exzision wird das Herz in die Langendorff-Apparatur verbracht und mit Carbogen äquilibrierter Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert. Die Ischämiezeit vom Zeitpunkt der Exzision bis zum Einbringen in die Apparatur liegt zwischen 20 und 40 sec bei 0-5°C. Durch die niedrige Temperatur wird ein hypothermieinduzierter Herzstillstand bewirkt, so dass keine größeren Alterationen des Myokardstoffwechsels zu erwarten sind. Nach einer 30minütigen Anpassungsphase in der Langendorff-Apparatur befinden sich die Herzen in einem stabilen Zustand und können in der Folge der ischämischen Belastung beziehungsweise der Erholung unter standardisierten Bedingungen ausgesetzt werden.

Das Prinzip der Methode besteht darin, Blut oder eine andere zur Erhaltung der Herz-tätigkeit geeignete, mit Sauerstoff angereicherte Flüssigkeit durch eine Kanüle, die in der Aorta ascendens eingebunden wird, herzwärts zu leiten. Dabei schließen sich infolge des retrograd gerichteten Perfusionsdruckes die Aortenklappen – wie während der Diastole –, so dass die Flüssigkeit ihren Weg durch die Kranzarterien nehmen muss. Nach Durchlaufen des Koronargefäßsystems fließt das Perfusat aus dem Sinus coronarius in den rechten Vorhof. Die Herzkammern bleiben weitgehend leer. Durch Unterbinden aller anderen Gefäße und Einführung eines Katheters durch die Arteria pulmonalis in die rechte Kammer kann die durch die Koronarien fließende Flüssigkeitsmenge gesammelt und quantitativ bestimmt werden.

3 Material und Methodik

Die Untersuchungen werden, mit Ausnahme der Gewinnung von Daten an „in situ- Herzen“, an isolierten Herzen von Ratten durchgeführt.

Im Folgenden werden der Aufbau und Betrieb der Perfusionsapparatur, die operative Vorbereitung der Ratten zur Gewinnung isolierter Herzen, die Maßnahmen an den isolierten Herzen zur Erhebung der Daten im Versuch, der Versuchsablauf sowie die Mess- und Statistik-Methoden dargelegt.

3.1 Versuchstiere

3.1.1 Herkunft und Haltungsbedingungen

Die Haltung und Behandlung der Versuchstiere sowie die Genehmigung für die Tierversuche entsprechen den gesetzlichen Forderungen und dem geltenden Tierschutzrecht.

Versuchstiere sind männliche Wistar-Ratten (Fa. Harlan-Winkelmann, Borcheln). Vor Beginn des Versuchs liegt das Gewicht der Tiere zwischen 250 und 280 g.

Die Tiere werden in Makrolonkäfigen der Größe 30 cm x 40 cm x 20 cm mit Gitterdeckel auf Tapvei-Espen-Einstreu gehalten (alles: Fa. Indulap, Garms/Schweiz). Sie erhalten als Trockenfutter „Hoeveler Mäuse-/Rattenfutter 10630“ (Fa. Höveler, Langenfeld) sowie Wasser ad libitum.

Die Haltung erfolgt bei einer Raumtemperatur von $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ und einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 12 : 12 Stunden.

Zwei Stunden vor Einleitung der Narkose wird den Tieren das Futter entzogen.

3.1.2 Einteilung der Versuchsgruppen

Die Ratten werden in zwei Gruppen eingeteilt:

Gruppe I: Kontrollgruppe ohne SOD-Behandlung

Die Herzen werden nach der Isolierung in der Langendorff-Versuchsanlage prä- und postischämisch getestet. An ihnen wird die Wirkung von Acetylcholin und Papaverin ermittelt.

Gruppe II: Gruppe mit SOD-Behandlung

Bei den Tieren dieser Gruppe werden die isolierten Herzen am Ende der Ischämie und kurze Zeit postischämisch mit SOD behandelt.

Auch hier wird gleichzeitig – wie in Gruppe I – die Wirkung von Acetylcholin und Papaverin getestet.

3.2 Aufbau und Betrieb der Perfusionsapparatur

Die Versuche an den isolierten Herzen werden in einer modifizierten Langendorff-Apparatur 15 (PIPER et al. 1992) durchgeführt, die in Abbildung 1 schematisch und in Abbildung 2 als Originalfoto des Versuchsaufbaus dargestellt ist.

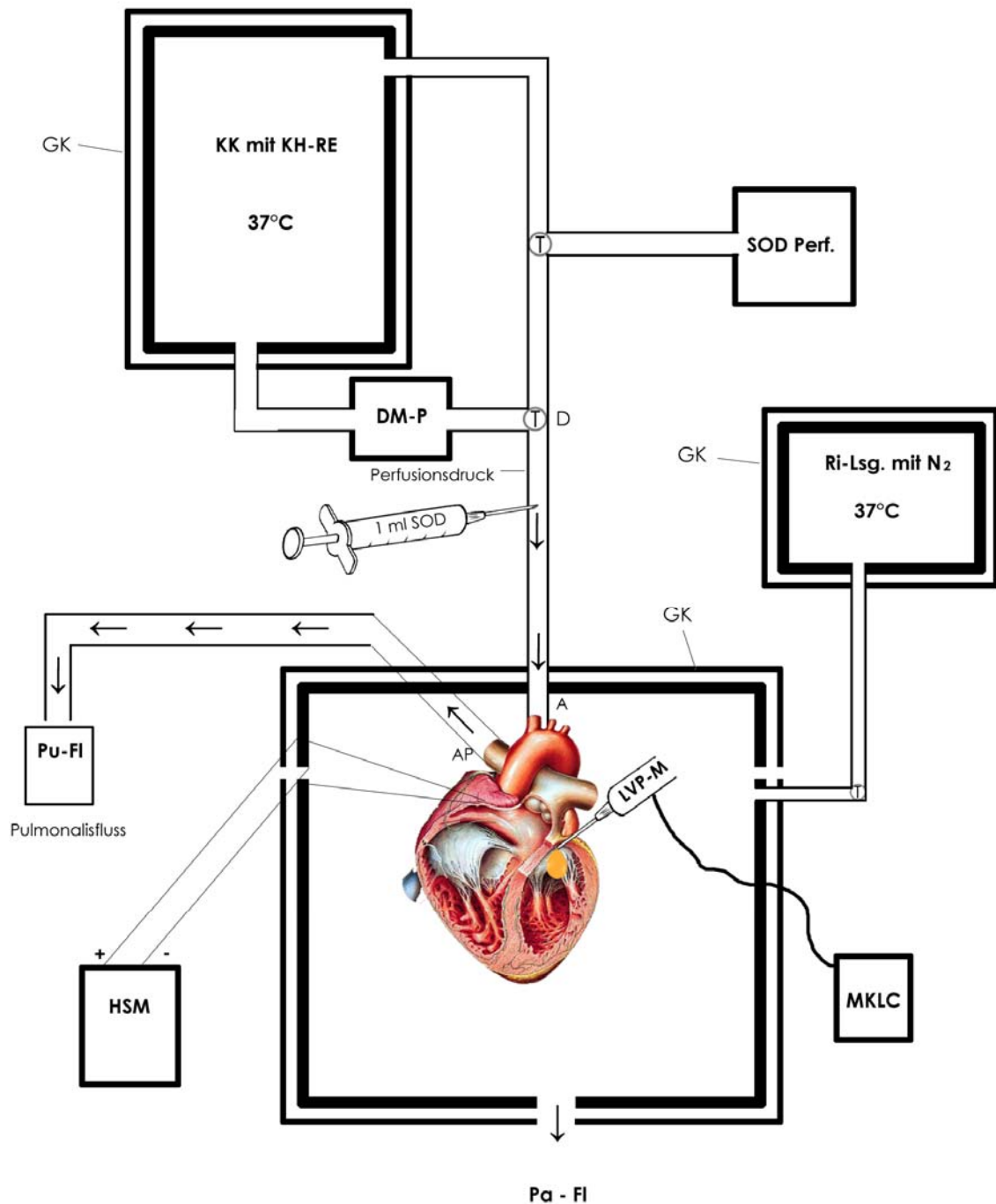


Abbildung 1: Schematische Darstellung der modifizierten Langendorff-Apparatur zur Perfusion von Rattenherzen mit Krebs-Henseleit-Lösung im offenen System : Zirkulation der Lösung vor der Perfusion und während der Ischämie im jeweils geschlossenen System. Temperierung des Systems und der Glaskammer auf 37°C (Legende siehe nächste Seite)

Legende zu Abbildung 1:

A	Aorta
AP	Arteria pulmonalis
D	Dreiwegehahn
DM-P	Druckmesser/Perfusionsdruck /Pumpe (Weiterleitung von Flüssigkeiten)
GK	Glaskammer
HSM	Herzschrirtmacher
KH	Krebs-Henseleit-Lösung
KK	Kugelkühler
LVP-M	Messung des linksventrikulären Druckes
MKLC	Mehrkanallinearecorder
N ₂	stickstoffäquilibriert
Pa-FI	Para-Fluss
Pu-FI	Pulmonal-Fluss (Probenentnahme für Messungen)
RE	Reservoir
Ri-Lsg.	Ringer-Lösung
SOD-Inj.	Superoxiddismutase-Injektion
SOD-Perf.	Superoxiddismutase-Perfusor



Abbildung 2: Modifizierte Langendorff-Apparatur

Das System besteht aus einem Reservoirgefäß, einer Pumpe zur Förderung des Perfusates, einem senkrecht stehenden Kugelkühler sowie den Überleitungen (Schlauchverbindungen). Eine Glaskammer umgibt das isolierte Herz.

Die Langendorff-Apparatur gewährleistet einen Kreislauf. Die gewünschte Temperatur von 37°C und der entsprechenden pO₂ werden konstant aufrechterhalten, solange das isolierte Herz noch nicht durchströmt wird. Es wird als offenes System zur Durchströmung des isolierten Herzens betrieben.

Nach der Durchströmung des isolierten Herzens wird das Perfusat über einen Katheter in der A. pulmonalis abgeleitet. Die Perfusatsmengen, die am Herzen abtropfen, können in der Glaskammer abfließen. Der Fluss über den Katheter in der Pulmonalarterie und der am Herzen abtropfende so genannte "Parafluss" können getrennt bestimmt werden.

Das Reservoirgefäß, der Kugelkühler sowie die Glaskammer für das Herz sind doppelwandig. Sie können mit temperiertem Wasser umspült werden.

Die Perfusionslösung wird in dem Reservoirgefäß und dem Kugelkühler jeweils von oben zugeführt und in Bodennähe abgezogen. Die Äquilibration der Lösung mit Carbogen (95% O₂ ; 5% CO₂) erfolgt gegenläufig von unten nach oben.

Der Perfusionsdruck wird über das Niveau der Perfusatlösung in dem Kugelkühler bestimmt. Zur Konstanthaltung des Perfusionsdruckes wird der Perfusatzustrom in den Kugelkühler mit Hilfe der Pumpe im System auf das benötigte Flüssigkeitsniveau reguliert. Unter dem Druck der Flüssigkeit schließen sich die Semilunarklappen und die Flüssigkeit fließt durch die Koronarien, die Herzkammern sind praktisch leer.

Das isolierte Herz wird von einer Organkammer umgeben, deren Kopfteil Öffnungen enthält, durch die Kabel zu den Schrittmacher-Elektroden, eine Metallkanüle zur Verbindung des Ballons im linken Ventrikel mit einem Druckaufnehmer und einen Katheter in der A. pulmonalis zur Erfassung des koronaren Perfusatflusses und „koronarvenöser“ Proben hindurchgeführt werden. Der letztgenannte Katheter endet in Höhe der Vorhof-Kammer-Grenze. In ihm befindet sich eine kleine Temperaturmesssonde.

Die Organkammer lässt sich über einen Seitenanschluss aus einem Reservoir mit N₂-äquibrierter Ringer-Lösung bis in Höhe der Vorhof-Kammer-Grenze des isolierten Herzens füllen. Über eine Öffnung im Boden der Organkammer kann während der Perfusion das Perfusat, das nicht über das koronare Gefäßsystem in den rechten Vorhof bzw. Ventrikel gelangt, als Parafluss gesammelt werden. Zu Ende einer Ischämieperiode wird auf diesem Wege die Ringer-Lösung aus der Organkammer abgelassen.

In der gemeinsamen Endstrecke befinden sich seitenständige Abgänge zur Messung des Perfusionsdruckes, zur Gewinnung von „koronar-arteriellen“ Perfusatproben sowie zur Applikation von Medikamenten. Mit Hilfe einer Messsonde wird die Temperatur des Perfusats in der gemeinsamen Endstrecke kontrolliert.

Die einzelnen Teile des Systems sind auf kürzesten Wegen mit gasdichten Schläuchen verbunden. Der Perfusatstrom wird durch einen Dreiwegehahn und eine Schlauchabklemmung in die jeweils gewünschte Richtung gelenkt.

Kugelhühler, Reservoir und Organkammer bestehen aus Glas und sind doppelwandig. Sie werden mit 37°C temperiertem Wasser umspült. Die Perfusate werden dem Kugelhühler und dem Reservoir von oben zugeführt und knapp oberhalb der Böden abgezogen. Die Gase, mit denen die Perfusate „äquibriert“ werden, strömen von unten in die Gefäße ein.

3.3 Herzentnahme

3.3.1 Anästhesie, Tracheotomie und kontrollierte Beatmung

Die Ratten erhalten als intramuskuläre Injektionsnarkose eine Mischung aus Ketavet® (Ketamin, 3mg/100 g KGW) und Rompun® (Xylazin, 0,6 mg/100 g KGW). Nach Eintritt der Narkose wird die Haut der ventralen Rumpfseite geschoren und die Ratte mit Hilfe von Haushaltsgummiringen an den Extremitäten in Rückenlage auf einem Operationstischchen für Nager fixiert.

Die Trachea wird stumpf präpariert und mit zwei Fäden unterlegt. Dabei dient der kranial liegende Faden zur Straffung der Trachea. Nach Tracheotomie wird der Tracheo-

tubus eingeführt und mit dem kaudal liegenden Faden fixiert. Als Trachealtubus wird ein auf 4 cm gekürzter Venenverweilkatheter (Fa. Steriflex) mit einem Außendurchmesser von 2,0 mm und einem Innendurchmesser von 1,5 mm verwendet. Er wird über ein Y-Stück mit dem Kleintier-Respirator RUS 1302 Universell (Fa. FMI Medical Instruments, Föhr) verbunden.

Die Beatmung wird mit möglichst kleinem Totraum auf eine Frequenz von 60/min und ein Atemzugvolumen von ca. 1,5 ml einreguliert.

3.3.2 Thorakotomie und Vorbereitung zur Herzentnahme

Die Haut wird ab ca. 0,5 cm kaudal des Unterkiefers in der Medianen bis ca. 2 cm kaudal des processus xyphoideus durchtrennt. Anschließend wird das Abdomen mit einem Längsschnitt entlang der Linea alba sowie rechts und links am Rippenbogen entlang nach lateral eröffnet. Der Thorax wird beidseitig durch zwei parasternal verlaufende Schnitte geöffnet, wobei die Thoraxwand unter Anhebung am Processus xyphoideus möglichst weit lateral bis in Höhe der Schlüsselbeine durchtrennt wird. Das Brustbein wird gespalten und die beiden vorderen Thoraxwandanteile nach kranial hochgeklappt und fixiert.

Die V. cava caudalis wird kurz oberhalb des Zwerchfells mit einem Faden für eine spätere Ligatur locker angeschlungen. Die Vv. cavae craniales dextra et sinistra werden stumpf freipräpariert und jeweils mit einem Faden locker fixiert. Die Aorta wird zwischen Truncus arteriosus und A. carotis communis sinistra freipräpariert und mit zwei Fäden unterlegt. Ein Faden dient zur Fixierung der Aorta beim Einführen der Aortenkanüle. Mit dem zweiten Faden wird die Aortenkanüle fixiert. Danach wird in die V. cava caudalis distal der späteren Ligatur eine Mischung aus Heparin (500 IE/ml) und Ringer-Lösung injiziert.

3.3.3 Herzentnahme

Zur Entnahme des Herzens werden die Ligaturen um die V.cava caudalis verknotet. Die A. pulmonalis wird eröffnet, die Aorta möglichst hoch im Aortenbogen kanüliert und

durchtrennt. Die Herzperfusion erfolgt mit Krebs-Henseleit-Lösung aus der Perfusionsapparatur, die über einen längeren Schlauch an die Aortenkanüle angeschlossen ist. Bis zum optimalen Sitz von Ligaturen und Kanüle wird das Anfangsvolumen niedrig gehalten. Ist die Aortenkanüle gut fixiert, wird der volle Perfusatstrom freigegeben. Die Vv. cavae craniales werden durch Ligaturen unterbunden, die Lungenhili abgebunden und die Lungen abgesetzt. Das Herz wird aus dem Situs entnommen und ohne Unterbrechung der Perfusion an die Apparatur angeschlossen.

Zwischen Unterbindung der Vena cava inferior und Aufnahme des vollen Perfusatstromes vergehen 25-45 Sekunden. Während dieser Zeit wird das Herz mit Ringer-Lösung von 4°C überspült.

Als Aortenkanüle dient eine 2 cm lange, an der Spitze rundgeschliffene Metallkanüle, die zur besseren Fixierung mit Querrillen ausgestattet ist. Ihr Außendurchmesser beträgt 2,0 mm und ihr Innendurchmesser 1,5 mm. Das freie Ende des Katheters passt in die gemeinsame Endstrecke des Perfusionssystems im Kopfteil der Organkammer.

3.4 Vorbereitung der isolierten Herzen für Messungen und Perfusion

Die A. pulmonalis wird mit einer auf ca. 2 cm gekürzten Metallkanüle (Außendurchmesser: 2,0 mm, Innendurchmesser: 1,3 mm), die an einem Ende rund geschliffen und mit Seitenlöchern versehen ist, kanüliert. Zum weiteren Anschluss wird auf der Gegenseite ein Venenverweilkatheter mit Luer-Ansatzstück (Fa. Vygon Medizinisch-Chirurgische Werke, Aachen) von etwa 20 cm Länge verwendet. Er wird bis in den rechten Ventrikel geschoben und eingebunden. Das freie Ende wird in Höhe der Vorhof-Kammer-Grenze fixiert. Über diesen Katheter wird eine feine Temperaturmesssonde bis in die Spitze der Metallkanüle vorgeschoben.

Das linke Herzohr wird eröffnet, und in den linken Ventrikel ein Latexballon (Fa- Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) Größe 4 eingebracht. Er hat ein Volumen von 0,06 ml und ist an einer Metallkanüle angeschlossen.

Auf dem rechten Vorhof werden zwei Platinelektroden befestigt, die über flexible Kabel mit einem externen Herzschrittmacher (Modell EDPm20, Fa. Biotronik, Berlin) verbun-

den werden. Der Schrittmacher wird mit einer Frequenz von 300/min bei einer Spannung von 4 V (+5%) und einer Reizdauer von 0,9 ms (+5%) betrieben. Anhand registrierter linksventrikulärer Druck-Kurven wird die Frequenzstimulation überprüft.

Abschließend wird das Herz in der Organkammer eingeschlossen.

3.5 Messungen an den isolierten Herzen

Während der Untersuchungen werden zu festen Zeitpunkten der koronare Fluss und der linksventrikuläre Druck gemessen. Die Temperatur beträgt während des gesamten Versuches 37°C.

3.5.1 Koronarer Fluss

Als koronarer Fluss gilt die Flüssigkeitsmenge, die über den Katheter in die A. pulmonalis abfließt. Getrennt davon kann der Parafluss bestimmt werden. Er resultiert aus der Undichtigkeit der Aortenklappen und Flüssen über die Vv. thebesii (DÖRING und DEHNERT 1985). Die Flüsse werden über eine Minute mit Hilfe eines Messglases und einer Stoppuhr gemessen. Der koronare Fluss wird später als Fluss pro Minute auf ein Gramm ödemfreies Herzgewicht umgerechnet.

3.5.2 Linksventrikulärer Druck und abgeleitete Größen

Für die Bestimmung des linksventrikulären Druckes und abgeleiteter Parameter wie maximale Druckanstiegs- und Druckabfall-Geschwindigkeit ($+dp/dt_{max}$, $-dp/dt_{max}$) wird der im linken Ventrikel platzierte Latexballon über eine Metallkanüle mit dem Druckaufnehmer P 23 ID (Statham Element, Fa. Gould, USA) verbunden. Die Messungen werden mit Hilfe einer Druckmessbrücke mit Differenzierglied (Servomed, Fa. Heilige, Freiburg) durchgeführt. Die Daten werden mittels Mehrkanal-Linearrecorder (Graphtec WR 3001, Watanabe Instruments Japan, Vertrieb: Fa. Hugo Sachs Elektronik,

March-Hugstetten) registriert. Die Papiervorlaufgeschwindigkeit liegt bei 100 mm/sec und wird vor ACh- und PAP-Injektion auf 250 mm/sec erhöht.

Über einen Dreiwegehahn ist eine Spindelspritze (Glas-Metall-Spritze) angeschlossen, mit deren Hilfe das System gefüllt und der Ballon in Feinabstimmung auf einen enddiastolischen Druck von 4 mm Hg (Vorlast) vorgespannt beziehungsweise wieder entlastet werden kann. Das System wird mit einer Wasser-Äthanol-Mischung (1:1) gefüllt, die wegen der geringeren Löslichkeit von Luft und der damit geringeren Luftbläschenbildung im System besonders günstig ist (DÖRING und DEHNERT 1985). Nach Eichung des Systems lassen sich aus den aufgezeichneten Kurven der maximale linksventrikuläre Druck (LVP), der (diastolische) linksventrikuläre Druck während Ischämie sowie $+dp/dt_{max}$ und $-dp/dt_{max}$ bestimmen. Anhand der Druckkurven wird auch die Herzfrequenz bestimmt.

3.6 Perfusionslösungen

Für die präischämische Perfusion und die postischämische Reperfusion wird eine Krebs-Henseleit-Puffer-Lösung (HEARSE und CHAIN 1972) verwendet (Fa. Sigma Chemicals, Deisenhofen), die durch Zugabe von Ca-Ethylendiaminetetraazetat (EDTA) modifiziert wurde (Tabelle 1).

Die Lösungen werden jeweils frisch angesetzt. Vor einem Versuch werden sie durch einen Membranfilter mit 0,45 µm Porengröße passiert.

Tabelle 1: Modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung zur Perfusion und Reperfusion isolierter Rattenherzen (Alle Angaben in mmol/l)

NaCl	118,0
KCl	4,7
CaCl ₂	2,5
MgSO ₄	1,2
MgCl ₂	15,0
KH ₂ PO ₄	1,2
NaHCO ₃	25,0
Glukose	5,0
Ca-EDTA	0,5
Procainhydrochlorid	1,2

3.7 Medikationen

Zu festgelegten Zeitpunkten wird prä- und post-ischämisch Acetylcholin (Fa. Sigma Chemicals, Deisenhofen) oder Papaverin (Fa. Sigma Chemicals, Deisenhofen) in Krebs-Henseleit-Lösung als jeweils 1,0 ml-Bolus in die Endstrecke des Perfusionssystems injiziert.

Die Konzentration von ACh beträgt 10^{-7} mol/l, die Konzentration von PAP 10^{-4} mol/l. Die Lösungen werden am Versuchstag frisch hergestellt.

In einem Teil der Versuche werden 4 mg/ml Superoxiddismutase (Fa. Grünenthal, Aachen-Stolberg) appliziert. Zuerst wird 1 ml des Präparates unverdünnt als Bolusinjektion gegeben. Anschließend folgen 10 ml einer SOD-Verdünnung aus 1 ml SOD und 9 ml Ringerlösung. Dieses Gemisch wird in die Endstrecke des Perfusionssystems gegeben.

Postischämisch auftretendes Kammerflimmern wird durch Injektion von 0,2 ml Xylocain 2% in die Endstrecke des Perfusionssystems behandelt.

3.8 Versuchsablauf

Bei den Versuchen werden 2 Gruppen miteinander verglichen: Eine Kontrollgruppe ohne SOD-Behandlung („ohne Endothelschutz“) und eine SOD-behandelte Gruppe („mit Endothelschutz“).

Eine schematische Darlegung der Versuchsabläufe zeigt Abbildung 3.

Parallel zur Flussmessung erfolgt jeweils die Messung von LVP und $\pm dp_{max}$.

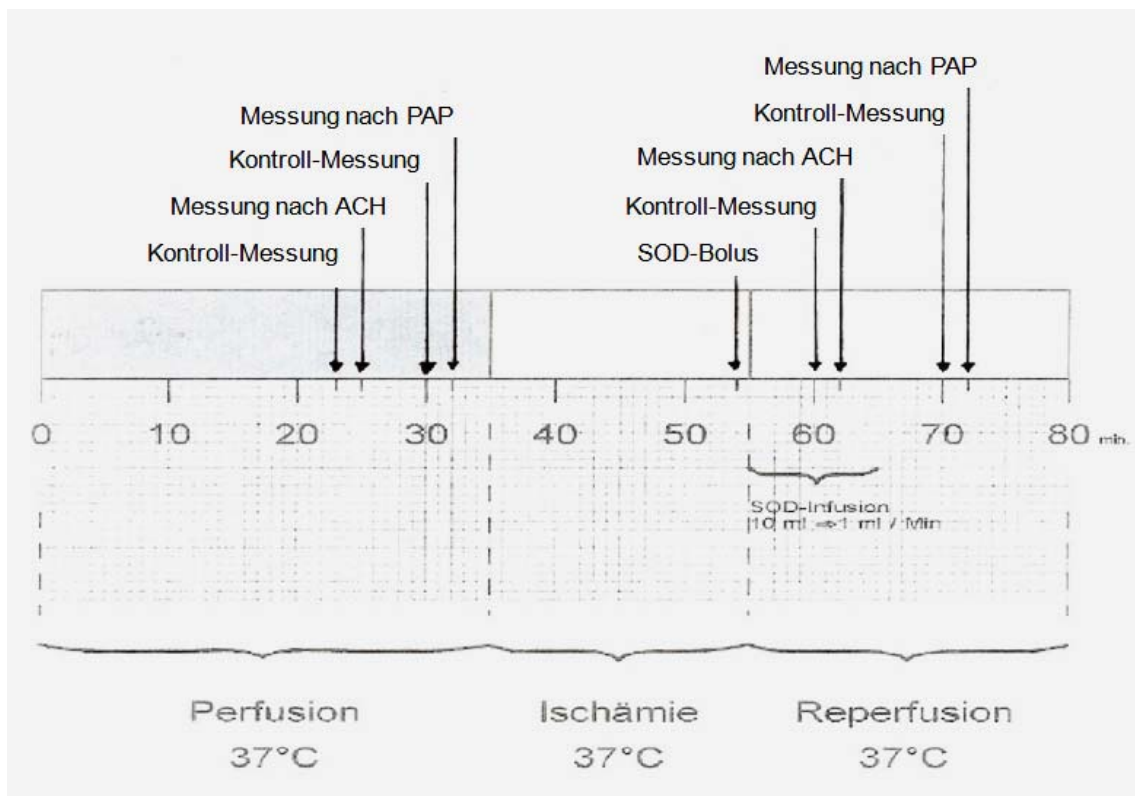


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.

3.8.1 Perfusionsphase

Noch in situ beginnt sofort nach Eröffnung von Aorta und Lungenarterie die Perfusion über die Aorta mit Krebs-Henseleit-Lösung aus der Perfusionsapparatur. Dieser Moment wird als Zeitpunkt Null definiert. Nach längstens drei Minuten, meist jedoch schneller, befindet sich das isolierte Herz in der Perfusionsanlage. Nach spätestens 12 Minuten sind alle Manipulationen am Herzen beendet (siehe Kapitel 3.3 und 3.4).

Die Perfusion wird bei einem statischen Druck von 75 mm Hg und einer Temperatur von 37°C durchgeführt.

Die verschiedenen Parameter werden zur Beurteilung der Stabilität des isolierten Herzens in Zeitabständen von 5 bis 10 Minuten gemessen und registriert. Anhand der Parameter kann nach spätestens 20 Minuten Perfusion von einer manifesten Situation ausgegangen werden, von wo aus man die isolierten Herzen vergleichen und die Befunde gegenüberstellen kann.

In Gruppe 1 (ohne SOD-Behandlung, d.h. „ohne Endothelschutz“) dauert die Perfusion mit Krebs-Henseleit-Lösung 35 Minuten. Die nach 23 min Perfusion gemessenen Werte werden als prä-ischämische Ausgangswerte bezeichnet.

In Gruppe 2 (mit SOD-Behandlung, d.h. „mit Endothelschutz“) dauert die Perfusion mit KH-Lösung 35 Minuten. In der 23. und 30. Minute werden jeweils Basis-Ausgangswerte gewonnen. In der 25. und 32. Minute werden 1 ml Acetylcholin- bzw. Papaverin-Lösung als Bolus injiziert und jeweils 30 Sekunden später alle Messungen über einen Zeitraum von 30 Sekunden wiederholt.

Ergänzend werden, bei sonst gleichem Ablauf, Versuche durchgeführt, bei denen zuerst Papaverin und dann Acetylcholin gegeben werden oder eine Medikation unterbleibt.

3.8.2 Ischämie

Die Ischämie verläuft in beiden Versuchsgruppen mit Unterbrechung der Koronarperfusion. Während dieser Zeit wird die Organkammer mit N₂-äquilibrierter Ringer-Lösung bis in Höhe der Vorhof-Kammer-Grenze der Herzen gefüllt.

Im Versuch 1 dauert die Ischämie 20 Minuten, d.h. bis zur 55. Minute der Gesamtversuchszeit. Die Temperatur beträgt 37°C. Während dieser Zeit ist der Herzschrittmacher abgestellt, der linksventrikulär liegende Ballon wird für diesen Zeitabschnitt nicht entlastet.

Im Versuch 2 dauert die Ischämie ebenfalls 20 Minuten und 55 Minuten der Gesamtversuchszeit. Die Temperatur während des Versuches beträgt 37°C. Wie in Versuch 1 bleibt der Herzschrittmacher während der Ischämie ausgeschaltet. Der linksventrikuläre Ballondruck bleibt aufrechterhalten, so dass die mechanische Aktivität des linken Ventrikels bis zum diastolischen Stillstand und die Spannungsänderungen während der Ischämie registriert werden können.

Bei Versuch 2 mit SOD-Schutz für die Reperfusion werden in der letzten Minute der Ischämie (55. Minute der Gesamtversuchsdauer) unter möglichst geringer Druckanwendung 1 ml Bolus SOD (4 mg) bzw. Ringer-Lösung über die Endstrecke des Perfusionssystems in das Herz appliziert.

3.8.3 Reperusionsphase

Die Reperfusionen werden mit Krebs-Henseleit-Lösung bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Der Perfusionsdruck beträgt 75 mm Hg und wirkt mit Freigabe des Perfusionsstroms praktisch sofort auf das Herz ein. Die Versuche werden mit einer Schockgefrierung der Herzen nach der Methode von WOLLENBERGER u. Mitarb. (1980) beendet.

Im Versuch 1 dauert die Reperfusion 25 Minuten. Damit werden die Versuche nach einer Gesamtdauer von 80 Minuten abgeschlossen. Während der 20 minütigen Reperfusion werden die Frequenzstimulationen wieder aufgenommen. Wiederholte Messungen erfolgen zu festgelegten Zeitpunkten.

Nach der 23., 25., 30. und 32. Minute der Perfusion und Reperfusion (60., 62., 70. und 80 Minuten Gesamtversuchszeit) werden Messungen als Ausgangsbasiswerte durchgeführt. In der 25. und 62. Minute (32. bzw. 72. Minute Gesamtversuchszeit) wird 1 ml Acetylcholin- bzw. Papaverin-Lösung als Bolus injiziert; jeweils 30 Sekunden später werden alle Messungen über einen Zeitraum von 30 Sekunden wiederholt. Die Versuche werden nach 25 Minuten Reperfusion, d.h. nach einer Gesamtversuchszeit von 80 Minuten, nach Abschluss der letzten Messungen, beendet.

In den Versuchen, bei denen in der letzten Minute der Ischämie SOD als Bolus appliziert wird, wird für die ersten 10 Minuten der Reperfusion SOD (1 ml = 4 mg) in Ringer-Lösung (9 ml) in die Endstrecke des Perfusionssystems infundiert (1 ml/min = 0,4 mg/min). Bei den anderen Versuchen wird nur Ringer-Lösung infundiert.

In einigen Versuchen wird, entsprechend der Medikationsreihenfolge während der Perfusion, auch während der Reperfusion, zuerst Papaverin und dann Acetylcholin gegeben oder auf jegliche Medikation verzichtet.

3.8.3.1 In situ-Herzen

Nach Abschluss der operativen Maßnahmen am Tier werden die Herzen anstelle einer Isolierung und Übernahme in die Perfusionsapparatur noch in situ mit der Zange nach WOLLENBERGER u. Mitarb. (1980) schockgefroren.

3.8.3.2 Perfusionsherzen

Das Vorgehen entspricht der in Abschnitt 3.8.1 beschriebenen Methode. Nach 80 Minuten wird der Versuch mit Schockgefrieren der Herzen beendet. Die Daten zur 30- und 120-Minuten-Perfusion entstammen anderen tierexperimentellen Arbeiten (SCHOCKHOVEN 1992; STEIN 1993; WINGENFELD 1993).

3.8.4 Übernommene Versuche

Um lebendes Tiermaterial einzusparen, werden zu Vergleichszwecken Daten aus drei anderen Versuchen des Instituts übernommen, die mit der gleichen Technik durchgeführt wurden. Damit lässt sich die Gruppengröße im Sinne einer statistisch relevanten Reproduzierbarkeit erhöhen.

3.9 Beendigung des Versuchs mittels Gefrierstopp

In der letzten Minute des Versuchs werden der linksventrikuläre Ballon, der Herzschrittmacher und die Pulmonaliskanüle entfernt. Die Vorhöfe und umliegendes Gewebe werden bis auf die Ventrikel sauber präpariert. Exakt am Ende der 55. Minute werden die Ventrikel mit der Gefrierstoppzange erfasst und zusammengedrückt. Die zusammengepressten Ventrikel werden von der Aortenkanüle gelöst und anschließend direkt in flüssigen Stickstoff getaucht (WOLLENBERGER et al. 1980).

Dieser Vorgang dauert maximal 2 Sekunden. Das Herz wird als flache Scheibe bei -40°C in Aluminiumfolie tiefgekühlt gelagert. Zu einem späteren Zeitpunkt kann es dann für die Gefriertrocknung weiter verarbeitet werden.

3.10 Präparation des Ventrikelgewebes zur analytischen Aufarbeitung

Das zu einer Scheibe von 2-3 mm Dicke schockgefrorene Ventrikelgewebe wird unter flüssigem Stickstoff in Aluminiumfolie bei -40°C für längstens eine Woche gelagert.

Das Ventrikelgewebe wird, wiederum unter flüssigem Stickstoff, mit Hilfe eines Dentalbohrers Typ 852 (Fa. Kavo, Leukirch/Allgäu) präpariert, wobei oberflächliche große Gefäße sowie Reste nicht ventrikulären Gewebes und gefrorenen Perfusats abgefräst werden.

3.11 Gefrier- und Hitzetrocknung des Ventrikelgewebes

Das präparierte Ventrikelgewebe wird tiefgefroren gewogen (gefrorenes Feuchtgewicht) und für mindestens fünf Tage im Vakuum bei -40°C in einem Gefriertrockner (L 102 2, Fa. WKF, Brandau) gefriergetrocknet und erneut gewogen.

Das gefriergetrocknete Gewebe wird nach Gewichtsbestimmung zum Teil zur weiteren Gewebeaufarbeitung für die Analysen verwendet (Gewebeprobe A).

Der verbleibende Teil wird nach Gewichtsbestimmung für 5-7 Tage bei 110°C bis zur Gewichtskonstanz hitzegetrocknet (Gewebeprobe B).

Die an Probe A ermittelte Differenz des Trockengewichtes nach Gefrier- und Hitzetrocknung wird zur Berechnung des Trockengewichtanteils am gefrorenen Feuchtgewebe der Probe B berücksichtigt, die wegen der späteren Analysen des Stoffwechselstatus nicht hitzegetrocknet werden darf.

3.12 Gewebeextraktion und Analyse des Stoffwechselstatus

Das gefriergetrocknete Ventrikelgewebe wird in ein vorgekühltes Glasgefäß mit eiskalter $0,3\text{ m HClO}_4$ (10 ml/g Feuchtgewicht, mindestens aber 5 ml) gegeben und im Eisbad mit Hilfe eines Ultraturrax (Fa. Janke und Kunkel, Staufen im Breisgau) homogenisiert und gleichzeitig enteweißt.

Vom Homogenat wird ein definiertes Volumen (ca. 0,5 ml) zur Bestimmung des Glykogens entnommen. Die Aufbereitung umfasst folgende Schritte: Aufschließung des Homogenats mit Natronlauge, Glykogenfällung durch Äthanol, Hydrolyse des Glykogens mit Salzsäure, Neutralisation des Hydrolysats und enzymatische Bestimmung der freigesetzten Glukose (ISSELHARD und MERGUET 1962; ISSELHARD et al. 1962).

Das verbleibende Homogenat wird nach 10 min Extraktionszeit zur Abtrennung der denaturierten Eiweiße zentrifugiert. Der klare Überstand wird gewonnen, sein Volumen bestimmt und mit 2 n KOH auf einen pH-Wert 7,0-7,2 eingestellt. Dabei fällt KClO_4 aus.

Zur Vervollständigung der Ausfällung von KClO_4 werden die Extrakte eingefroren und nach Auftauen vor den Analysen erneut zentrifugiert.

In den Gewebsextrakten werden die Konzentrationen an ATP, ADP, AMP, PKr, FKr und Laktat mit Hilfe quantitativ ablaufender enzymatischer Reaktionen als „optischer Test“ beziehungsweise UV-Test nach Warburg (WARBURG und NEGELEIN 1929) unter Beachtung gültiger Vorschriften bestimmt. Dabei werden die ablaufenden Reaktionen mit einer Oxidation bzw. Reduktion von NAD oder NADP bzw. NADH oder NADPH gekoppelt. Die reduzierten Formen haben andere Absorptionseigenschaften als die oxidierten. Als molare dekadische Extinktionskoeffizienten werden für NADH bzw. NADPH bei der Wellenlänge 340 nm ein Wert von $E = 6,00 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ und bei der Wellenlänge 366 nm ein Wert von $3,30 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ zugrunde gelegt.

Die ermittelten Substrat- und Metabolitkonzentrationen werden als Gewebsgehalte in $\mu\text{mol/g}$ Feuchtgewebe angegeben (HOHORST et al. 1962), wobei jeweils auf einen „idealen“ Trockengewichtsanteil am Feuchtgewicht von 22% korrigiert wird. Ein solcher Wert ergibt sich für die „in situ-Herzen“.

Aus den gemessenen Werten werden folgende metabolische Parameter abgeleitet:

$\text{SAN} = \text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}$ als Summe der Adeninnukleotide,

$\text{GKr} = \text{PKr} + \text{FKr}$ als Gesamtkreatin

$\text{ECP} = \frac{\text{ATP} \pm 0,5 \text{ ADP}}{\text{SAN}}$ als „energy charge potential“ (ATKINSON 1968)

PKr/GKr als Anteil des PKr am GKr.

3.13 Statistische Methoden

Die Messergebnisse werden jeweils als Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichung (s) berechnet. Aus Gründen einer besseren Übersichtlichkeit wird in den Abbildungen der mittlere Fehler des Mittelwertes ($\text{SEM} = \text{SD}/\mu n$) angegeben.

Es wurden folgende statistische Tests durchgeführt:

Der t-Test für unabhängige Stichproben testet die Nullhypothese, dass zwei Stichproben aus Populationen mit gleichem Mittelwert stammen (hier: Vergleich der Kontroll- und SOD-Gruppe hinsichtlich der untersuchten Parameter des linksventrikulären Stoffwechselstatus).

Beim t-Test für abhängige Stichproben werden zwei Stichproben verglichen, deren Elemente paarweise einander zugeordnet (hier z.B.: Unterschied zwischen den Zeitpunkten der Medikation in Kontroll- und SOD-Gruppe).

Als Signifikanzniveau wird $p < 0,05$ gewählt.

4 Ergebnisse

4.1 Körpergewicht

Am Tag der Herzentnahme wiegen die Tiere der Kontroll- und der SOD-Gruppe 220-295 g. Zwischen den beiden Gruppen bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede. Der Mittelwert der Kontrollgruppe (n = 10) beträgt 271 ± 14 g und der SOD-Gruppe (n = 10) 262 ± 16 g.

4.2 Ventrikelgewicht

Das Ventrikelgewicht (VG) nach Gefrier- und anschließender Hitzetrocknung, berechnet auf einen Trockengewichtsanteil von 22% am Feuchtgewicht, beträgt am Versuchstag im Mittel 680 ± 45 mg (n=20).

4.3 Temperatur

Die Temperatur von 37°C liegt nach der Herzisolation in allen Herzen beider Gruppen vor und wird während der gesamten Versuchsdauer kontrolliert und aufrechterhalten.

4.4 Koronarfluss

4.4.1 Veränderungen in beiden Gesamtgruppen (Kontrolle und SOD)

In der Kontrollgruppe ohne SOD steigt der Koronarfluss nach der ACh-Gabe von durchschnittlich $12,1 \pm 2,6$ ml (23. Minute) auf $14,5 \pm 2,9$ ml in der 25. Minute des Versuches an, auch in der SOD-Gruppe kommt es zu den gleichen Zeitpunkten zu einem Anstieg des Koronarflusses von $11,8 \pm 2,1$ ml/min auf $14,6 \pm 2,5$ ml/min (Tabelle 2).

In beiden Gruppen klingt die ACh-Wirkung nach etwa 5 Minuten wieder ab, die Werte betragen nun in der Kontrollgruppe $12,5 \pm 2,3$ ml/min und in der SOD-Gruppe $12,4 \pm 2,0$ ml/min. Im Anschluss an die PAP-Injektion erhöht sich der Koronarfluss auf

16,9 ± 2,2 ml/min (Kontrolle) beziehungsweise 16,6 ± 2,0 ml/min (SOD). Dies bedeutet, dass beide Gruppen präischämisch auf die ACh- und PAP-Gabe mit einem statistisch signifikanten Flussanstieg reagieren (Tabelle 3).

Nach der Ischämiephase kommt es im Anschluss an die ACh-Injektion nicht zu einem Anstieg des Koronarflusses in der Kontrollgruppe. Die Werte betragen 12,6 ± 2,3 ml/min vor und 12,3 ± 2,7 ml/min nach der ACh-Gabe. Dagegen beobachtet man in der SOD-Gruppe nach der ACh-Gabe in der 62. Minute eine deutliche, statistisch signifikante Flussteigerung von 11,4 ± 1,3 ml/min auf 13,9 ± 1,7 ml/min. Das bedeutet, dass nach der SOD-Gabe durch die ACh-Injektion eine ebenso deutliche Flussteigerung hervorgerufen werden kann wie vor der Ischämie.

Die Herzen beider Gruppen reagieren in der Reperfusionsphase auf die PAP-Gabe – wie vor der Ischämie – mit einer Flussteigerung (Abbildung 4).

Tabelle 2: Koronarfluss (ml/min), Mittelwerte ± Standardabweichungen.

Zeitpunkt der Messung (Minute)	Kontrollgruppe (n=10) Fluss (ml/min)	SOD-Gruppe (n=10) Fluss (ml/min)
23.	12,1 ± 2,6	11,8 ± 2,1
25. (ACh)	14,5 ± 2,9	14,6 ± 2,5
30.	12,5 ± 2,3	12,4 ± 2,0
32. (PAP)	16,9 ± 2,2	16,6 ± 2,0
60.	12,6 ± 2,3	11,4 ± 1,3
62. (ACh)	12,3 ± 2,7	13,9 ± 1,7
70.	9,1 ± 1,2	9,5 ± 1,4
72. (PAP)	12,0 ± 2,7	12,8 ± 2,5

(ACh = Acetylcholin, PAP = Papaverin)

Ergebnisse

Tabelle 3: Koronarfluss: Statistische Prüfung der Unterschiede zwischen den Zeitpunkten der Medikation in der Kontrollgruppe und der SOD-Gruppe (t-Test für abhängige Stichproben)

Zeitpunkt der Messung (Minute)	Kontrollgruppe (n=10) p	SOD-Gruppe (n=10) p	Differenz Kontroll-/SOD-Gruppe p
23./25. (ACh)	n.s. (p = 0,6)	0,01	n.s.
30./32. (PAP)	0,0001	0,0001	n.s.
60./62. (ACh)	n.s.	0,001	0,01
70./72. (PAP)	0,01	0,001	n.s.

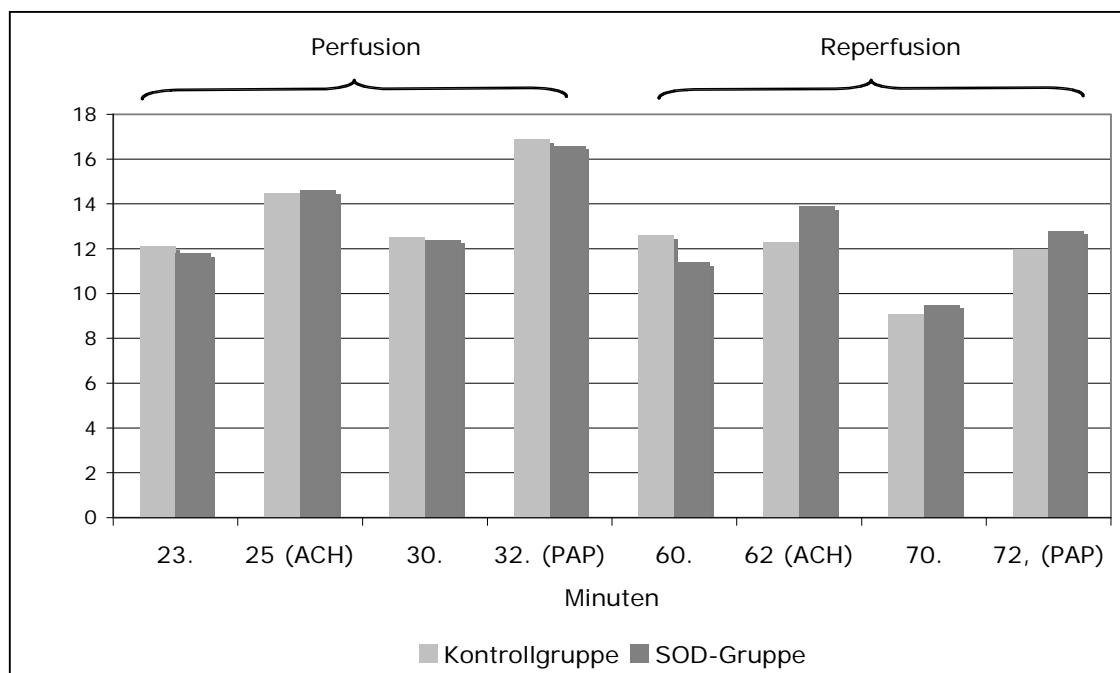


Abbildung 4: Koronarfluss nach der Applikation von ACh und PAP in der Kontroll- und SOD-Gruppe

4.4.2 Koronarfluss-Differenzen bei den Einzelversuchen in der Kontroll- und SOD-Gruppe

Während der Perfusion reagieren die Gefäße in beiden (Kontroll- und SOD-) Gruppen auf ACh und PAP mit einer Flussteigerung, d.h. Gefäßerweiterung. Nach der Ischämie bleibt in der Kontrollgruppe die Flussteigerung als Reaktion auf ACh aus, nur die mit SOD behandelten Gefäße reagieren auf ACh mit Flussteigerung. Dass dies nicht auf einer unspezifischen Empfindlichkeitsverminderung beruht, beweist die erhaltene Reaktion (d. h. Flussteigerung) nach PAP-Gabe in der Kontrollgruppe.

Die Flusserhöhungen in den Einzelversuchen sind in Abbildung 5 und Tabelle 4 zusammengefasst.

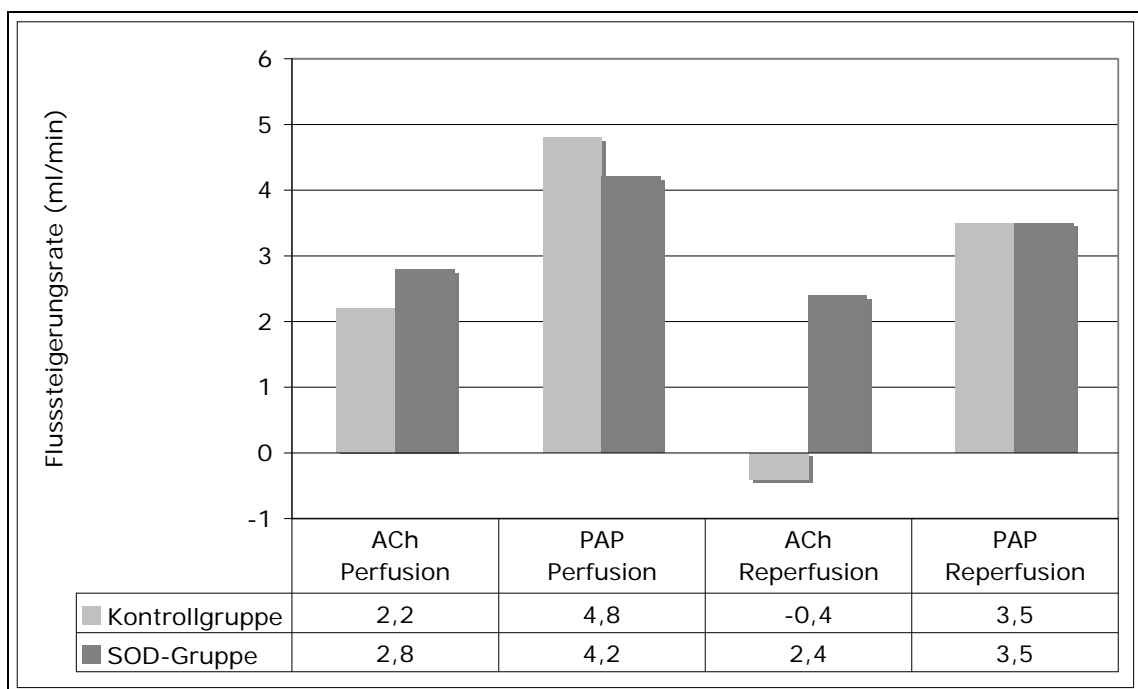


Abbildung 5: Koronarflussteigerung der Kontroll- und der SOD-Gruppe

Tabelle 4: Flussdifferenzen der Kontroll- und SOD-Gruppen in den Einzelversuchen in ml nach der Applikation von Acetylcholin und Papaverin ($\bar{x} \pm s$, t-Test für abhängige Stichproben).

Flusswerte vor der Applikation werden als 0 betrachtet. Die Signifikanzen beziehen sich immer auf den Unterschied zwischen der Flussrate vor und nach der Applikation. Postischämisch negative Werte in der Kontrollgruppe bedeuten, dass sich in manchen Fällen der Koronarfluss nach ACh-Injektion nicht erhöht, sondern niedriger ist als vorher.

Versuch - Nr.	ACh 23.-25. Minute	PAP 30.-32. Minute	ACh 60.-62. Minute	PAP 70.-72. Minute
Kontrollgruppe				
8066	1,5	4,0	-0,5	2,5
8068	2,5	4,0	0,0	3,0
8070	5,5	8,5	0,0	3,0
8074	2,0	2,5	0,5	3,0
8083	0,5	5,5	-2,5	4,5
8084	3,0	5,5	-1,0	4,5
8085	1,5	5,0	0,0	2,0
8095	2,0	3,5	0,0	2,0
8099	1,5	3,5	0,0	2,5
8102	2,0	6,0	-0,5	8,0
$\bar{x} \pm s$	$2,2 \pm 1,34$ $p < 0,0001$	$4,8 \pm 1,70$ $p < 0,001$	$-0,4 \pm 0,84$ n.s.	$3,5 \pm 1,81$ $p < 0,001$
SOD –Gruppe				
8078	4,5	4,5	2,5	3,5
8079	2,5	4,5	1,5	4,5
8082	1,0	6,0	1,0	1,5
8092	2,5	4,0	3,0	3,5
8093	2,0	1,5	2,0	3,0
8096	3,5	3,5	3,5	2,0
8097	2,5	3,5	3,0	2,5
8098	3,0	5,0	3,0	7,0
8100	4,0	5,0	1,5	3,5
8103	2,5	4,0	3,0	4,0
$\bar{x} \pm s$	$2,8 \pm 1,01$ $p < 0,001$	$4,2 \pm 1,20$ $p < 0,001$	$2,4 \pm 0,84$ $p < 0,001$	$3,5 \pm 1,53$ $p < 0,001$

4.5 Herzmechanik

Zur Beurteilung der Herzmechanik werden der maximale linksventrikuläre Druck (LVDmax) sowie die maximale Druckerhöhung (+dp/dtmax) und Druckabfallgeschwindigkeit (-dp/dtmax) in der Perfusions- und Reperfusionsphase bestimmt. Durch die Stimulation des Herzens mittels eines Herzschrittmachers wurde die Frequenz konstant gehalten und kontrolliert. Das gilt nicht für die Ischämiephase.

4.5.1 Maximaler linksventrikulärer Druck (LVD max)

In der präischämischen Phase erhöht sich der maximale linksventrikuläre Druck (LVDmax) als Reaktion auf eine ACh-Gabe statistisch signifikant von $119 \pm 16,3$ mmHg auf $177 \pm 29,1$ mmHg (Kontroll-Gruppe) beziehungsweise von $121 \pm 16,6$ mmHg auf $195 \pm 28,2$ mmHg (SOD-Gruppe, Tabelle 5, Abbildung 5). Nach einer späteren PAP-Gabe erhöht er sich von $100 \pm 20,6$ mmHg auf $179 \pm 25,7$ mmHg (Kontroll-Gruppe) beziehungsweise von $109 \pm 15,0$ mmHg auf $173 \pm 33,9$ mmHg (SOD-Gruppe). Die Erhöhung des LVDmax als Reaktion auf ACh und PAP ist in der Kontrollgruppe wie auch in der SOD-Gruppe statistisch signifikant ($p < 0,001$).

Nach der Ischämie reagieren die Herzen auf ACh in der Kontrollgruppe ebenfalls mit einer Druckerhöhung von $85 \pm 1,67$ mmHg auf $140 \pm 16,7$ mmHg und in der SOD-Gruppe von $87 \pm 11,2$ mmHg auf $139 \pm 18,1$ mmHg. Die Reaktion auf PAP bleibt auch am Ende der Ischämie erhalten. Der LVDmax erhöht sich in der Kontrollgruppe von $74 \pm 13,1$ mmHg auf $139 \pm 21,5$ mmHg und in der SOD-Gruppe von $81 \pm 9,0$ mmHg auf $143 \pm 15,6$ mmHg.

Zwischen beiden Versuchsgruppen treten keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Druckveränderungen nach Gabe von ACh oder PAP auf (Tabelle 6).

Insgesamt ist im Laufe des Versuches ein allmählicher Druckabfall des LVDmax zu beobachten. In beiden Gruppen sind die Messwerte in der postischämischen Reperfusion niedriger als in der präischämischen Phase. Auch nach der Behandlung mit SOD kann der Abfall der Werte nicht ganz unterbunden werden.

Ergebnisse

Tabelle 5: Maximaler linksventrikulärer Druck (LVDmax, in mmHg), ($\bar{x} \pm s$)

Zeitpunkt der Messung (Minute)	Kontrollgruppe (n=10)	SOD-Gruppe (n=10)
23.	119 \pm 16,3	121 \pm 16,6
25. (ACh)	177 \pm 29,1	195 \pm 28,2
30.	100 \pm 20,6	109 \pm 15,0
32. (PAP)	179 \pm 25,7	173 \pm 33,9
60.	85 \pm 16,7	87 \pm 11,2
62. (ACh)	140 \pm 16,7	139 \pm 18,1
70.	74 \pm 13,1	81 \pm 9,0
72. (PAP)	139 \pm 21,5	143 \pm 15,6
80.	65 \pm 18,5	67 \pm 10,2

Tabelle 6: LVDmax: Statistische Prüfung der Unterschiede zwischen den Zeitpunkten der Medikation in der Kontrollgruppe und der SOD-Gruppe (t-Test für abhängige Stichproben)

Zeitpunkt der Messung (Minute)	Kontrollgruppe (n=10) p	SOD-Gruppe (n=10) p	Differenz Kontroll- /SOD-Gruppe p
23./25. (ACh)	0,0001	0,0001	n.s.
30./32. (PAP)	0,0001	0,0001	n.s.
60./62. (ACh)	0,0001	0,0001	n.s.
70./72. (PAP)	0,0001	0,0001	n.s.

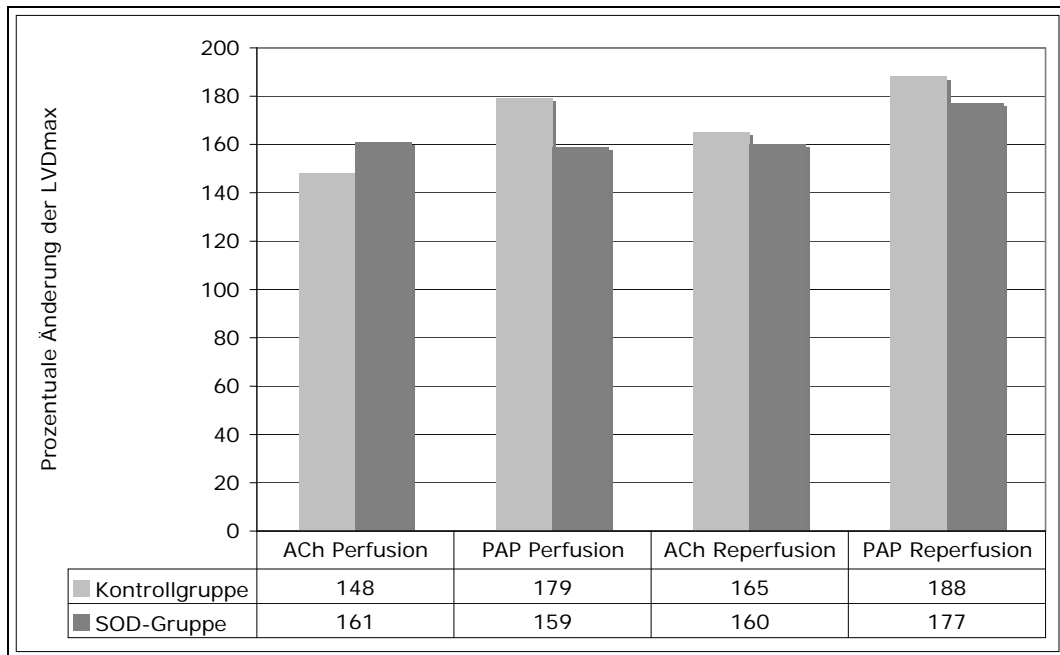


Abbildung 6: Maximaler linksventrikulärer Druck (LVDmax) in mmHg in der Kontroll- und der SOD-Gruppe

4.5.2 Maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (+dp/dpmax)

Die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit auf ACh beziehungsweise PAP ist in der Kontrollgruppe wie auch in der SOD-Gruppe deutlich erhöht (Tabelle 7). In der Perfusionsphase erhöhen sich die maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeiten nach ACh-Gabe sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der SOD-Gruppe (Tabelle 7). Die Höhe des Anstiegs von +dp/dtmax beträgt in der Kontrollgruppe durchschnittlich 172% und in der SOD-Gruppe 185% (Abbildung 7). Unter Gabe von PAP kommt es zu einem Anstieg der +dp/dtmax von 209% (Kontrolle) beziehungsweise 200% (SOD).

Nach der Ischämie reagieren die Herzen in der Kontrollgruppe wie auch in der SOD-Gruppe auf ACh ebenfalls mit einer Erhöhung der Druckanstiegsgeschwindigkeit auf 177% beziehungsweise 172%. Nach PAP-Injektion steigert sich die +dp/dtmax in der Kontrollgruppe um 202%, in der SOD-Gruppe um 187%. Die Reaktion auf PAP bleibt auch am Ende der Ischämie erhalten. Am Ende der postischämischen Erholungsphase sind in beiden Gruppen die maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeiten gegenüber den Ausgangswerten vermindert (Tabelle 7).

Ergebnisse

Tabelle 7: Maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeiten (+ dp/dt max)
(mmHg/sec, $\bar{x} \pm s$)

Zeitpunkt der Messung (Minute)	Kontrollgruppe	SOD -Gruppe
23.	2620 \pm 399	2630 \pm 374
25. (ACh)	4500 \pm 485	4866 \pm 644
30.	2150 \pm 387	2310 \pm 281
32. (PAP)	4490 \pm 709	4622 \pm 712
60.	1930 \pm 334	1938 \pm 244
62. (ACh)	3410 \pm 586	3333 \pm 522
70.	1780 \pm 305	1900 \pm 189
72. (PAP)	3600 \pm 709	3544 \pm 559
80.	1530 \pm 416	1680 \pm 155

Tabelle 8: +dp/dtmax: Statistische Prüfung der Unterschiede zwischen den Zeitpunkten der Medikation in der Kontrollgruppe und der SOD-Gruppe (t-Test für abhängige Stichproben)

Zeitpunkt der Messung (Minute)	Kontrollgruppe (n=10) p	SOD-Gruppe (n=10) p	Differenz Kontroll- /SOD-Gruppe p
23./25. (ACh)	0,0001	0,0001	n.s.
30./32. (PAP)	0,0001	0,0001	n.s.
60./62. (ACh)	0,0001	0,0001	n.s.
70./72. (PAP)	0,0001	0,0001	n.s.

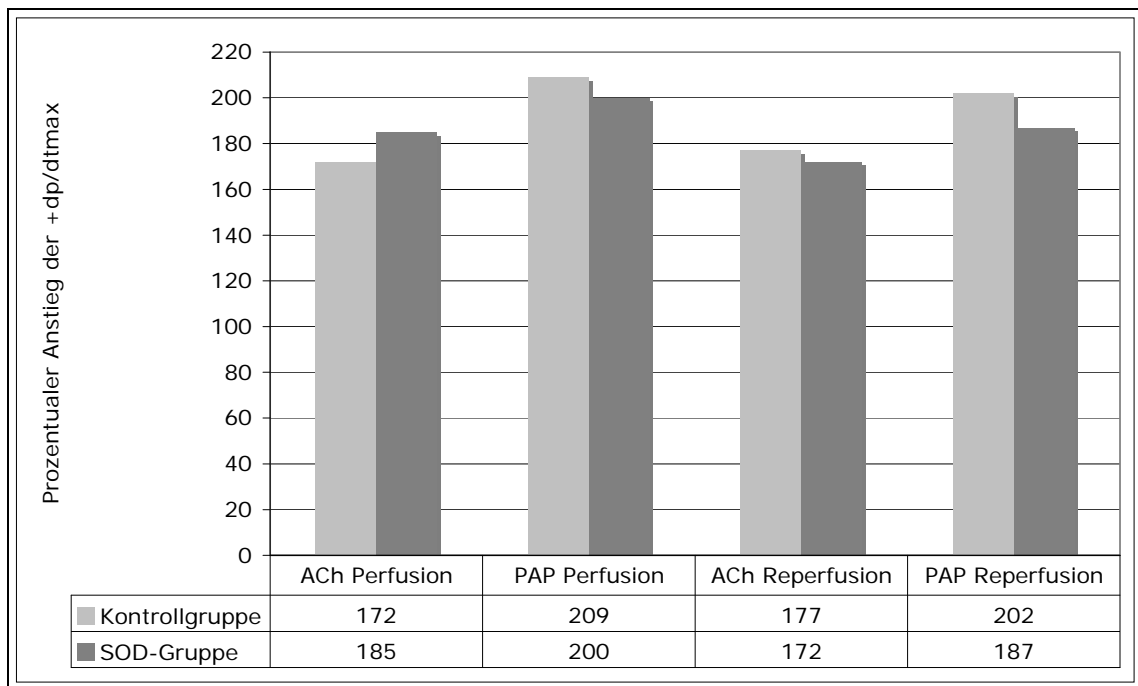


Abbildung 7: Prozentuale Änderung der maximalen linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit +dp/dtmax.

4.5.3 Maximale linksventrikuläre Druckabfallgeschwindigkeit (-dp/dtmax)

Auch bezüglich der Druckabfallgeschwindigkeit $-dp/dt_{max}$ kommt es in beiden Gruppen jeweils nach Gabe von ACh oder PAP sowohl in der Perfusions- als auch in der Reperfusionsphase zu Steigerungen gegenüber den vorhergehenden Messwerten (Tabelle 9). Es fällt auf, dass die prozentualen Steigerungsraten der $-dp/dt_{max}$ in beiden Gruppen kontinuierlich anwachsen (Abbildung 8).

Die Reaktion auf PAP bleibt auch hinsichtlich der Druckabfallgeschwindigkeit erhalten (Tabelle 9).

Ergebnisse

Tabelle 9: Maximale linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit: (- dp/dt max)
(mmHg/sec, $\bar{x} \pm s$)

Zeitpunkt der Messung (Minute)	Kontrollgruppe	SOD-Gruppe
23.	1920 \pm 339	1910 \pm 307
25. (ACh)	2160 \pm 481	1744 \pm 332
30.	1600 \pm 377	1650 \pm 272
32. (PAP)	2100 \pm 356	1766 \pm 406
60.	1450 \pm 366	1320 \pm 343
62. (ACh)	1970 \pm 320	1755 \pm 292
70.	1230 \pm 263	1350 \pm 207
72. (PAP)	1910 \pm 304	1900 \pm 173
80.	1020 \pm 368	1020 \pm 225

Tabelle 10: -dp/dtmax: Statistische Prüfung der Unterschiede zwischen den Zeitpunkten der Medikation in der Kontrollgruppe und der SOD-Gruppe (t-Test für abhängige Stichproben)

Zeitpunkt der Messung (Minute)	Kontrollgruppe (n=10) p	SOD-Gruppe (n=10) p	Differenz Kontroll- /SOD-Gruppe p
23./25. (ACh)	n.s.	n.s.	n.s.
30./32. (PAP)	n.s.	n.s.	n.s.
60./62. (ACh)	0,01	0,01	n.s.
70./72. (PAP)	0,0001	0,0001	n.s.

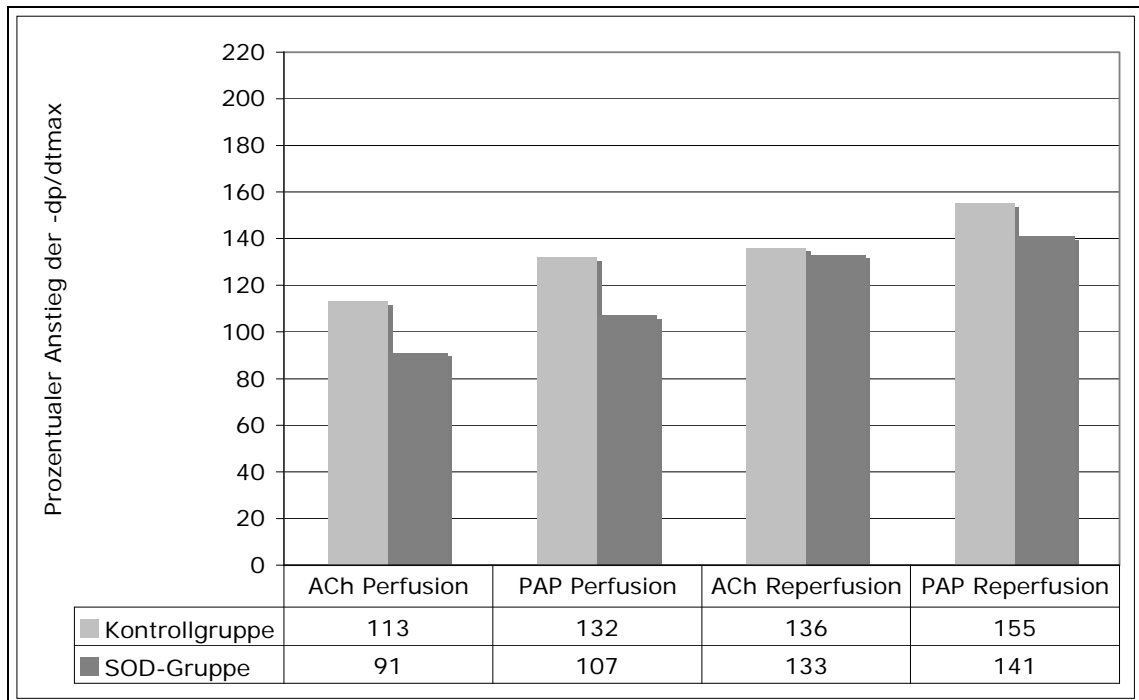


Abbildung 8: Prozentuale Änderung der maximalen linksventrikulären Druckabfallgeschwindigkeit $-dp/dt_{max}$

4.6 Graphische Darstellung des linksventrikulären Drucks

Abbildung 9 zeigt die Änderungen des linksventrikulären Druckes.

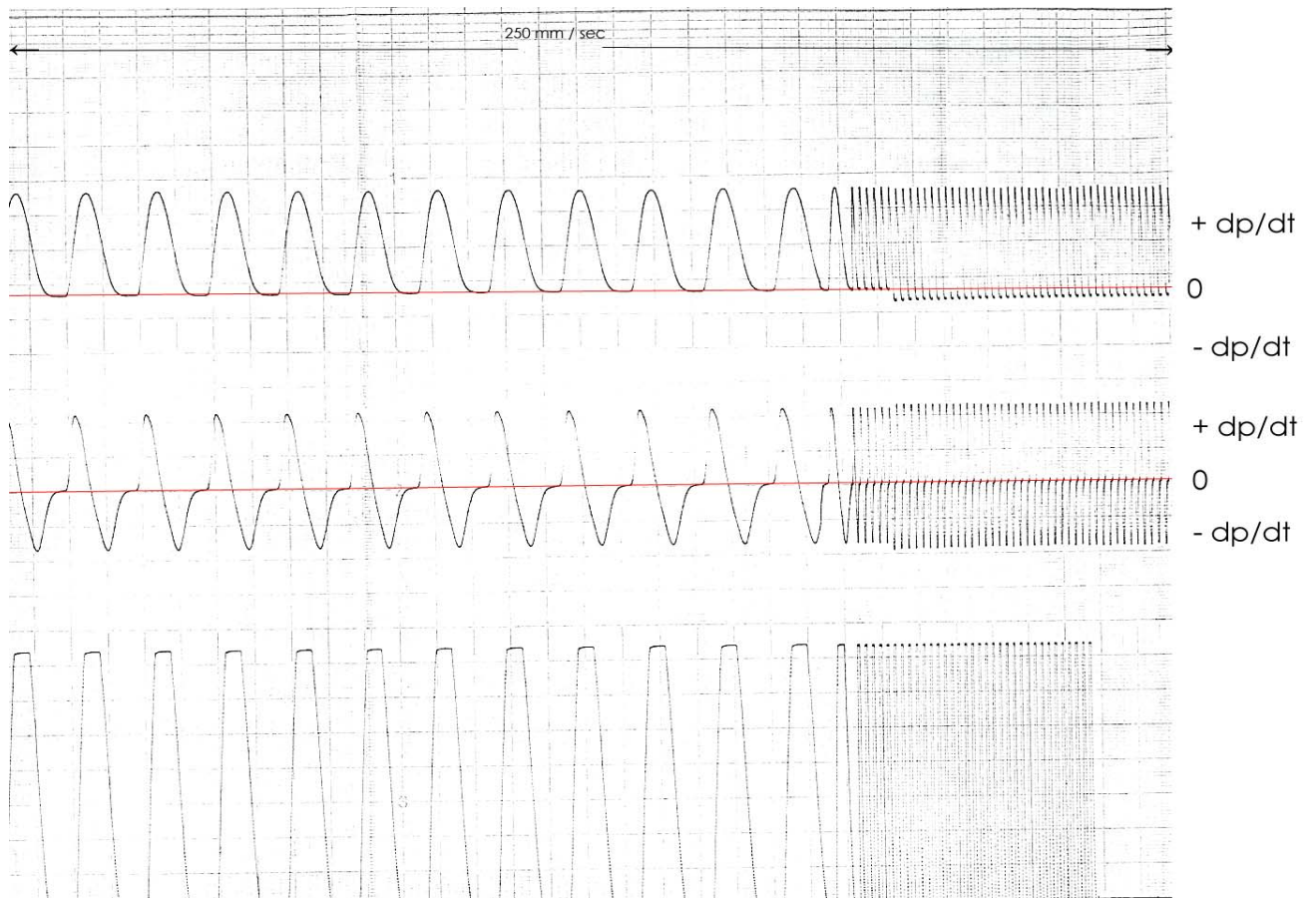
Die Ausschläge oberhalb der Nulllinie stehen für $+dp/dt_{max}$ und die Ausschläge unterhalb der Nulllinie für $-dp/dt_{max}$.

Unmittelbar vor der ACh- bzw. PAP-Injektion wird die Papierbandgeschwindigkeit von 100 mm/sec auf 250 mm/sec erhöht, um die einzelnen Kontraktionen graphisch zu ermitteln.

Bei einer Dosierung von 10^{-7} ACh und 10^{-4} PAP kommt es zu einer Druckerhöhung im linken Ventrikel und gleichzeitig zu einer Veränderung von $+dp/dt_{max}$, und $-dp/dt_{max}$.

Nach der Ischämie liegen ähnliche Verhältnisse vor.

Ergebnisse



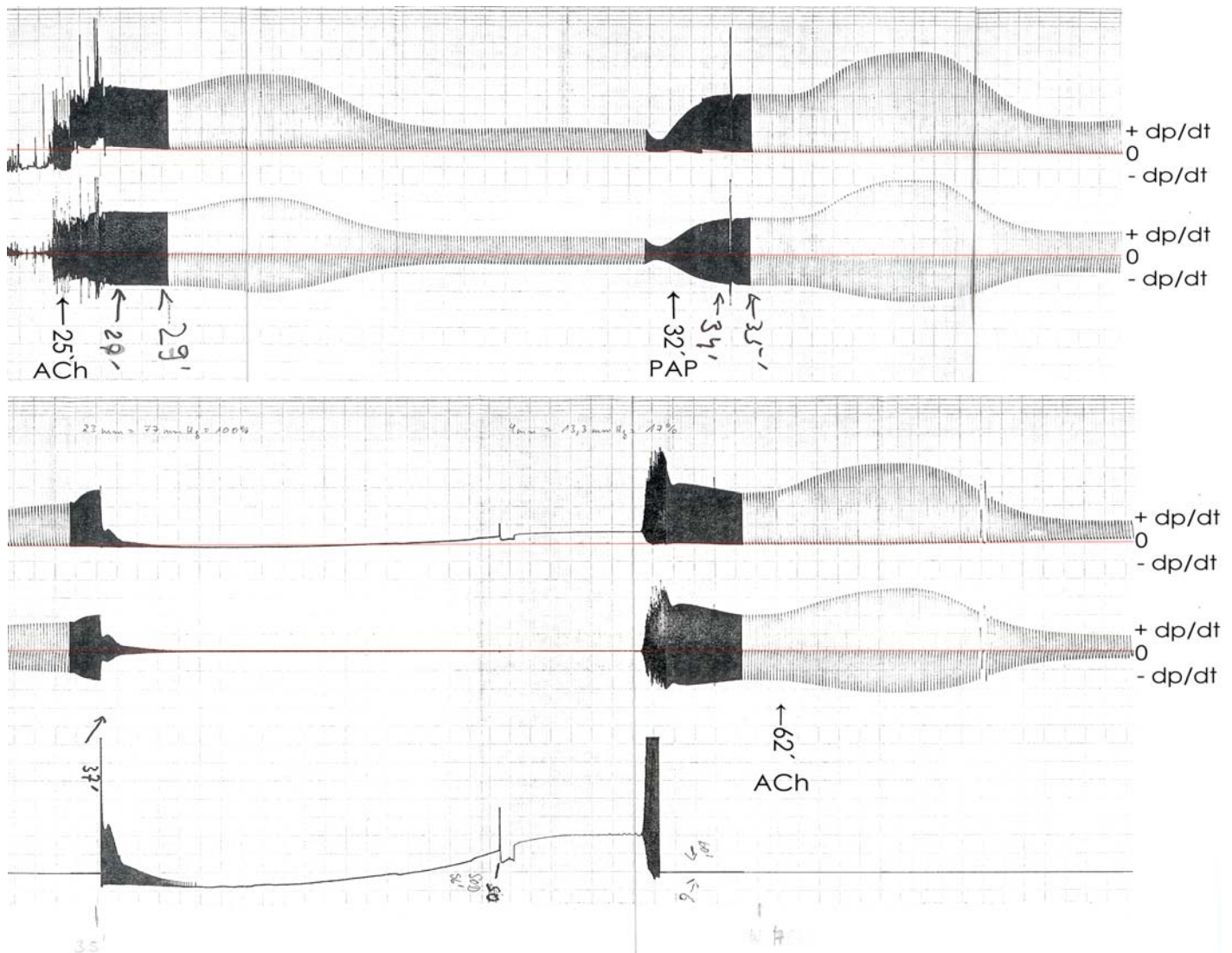


Abbildung 9: Graphische Darstellung des linksventrikulären Druckes, Erläuterungen siehe Text (S. 41)

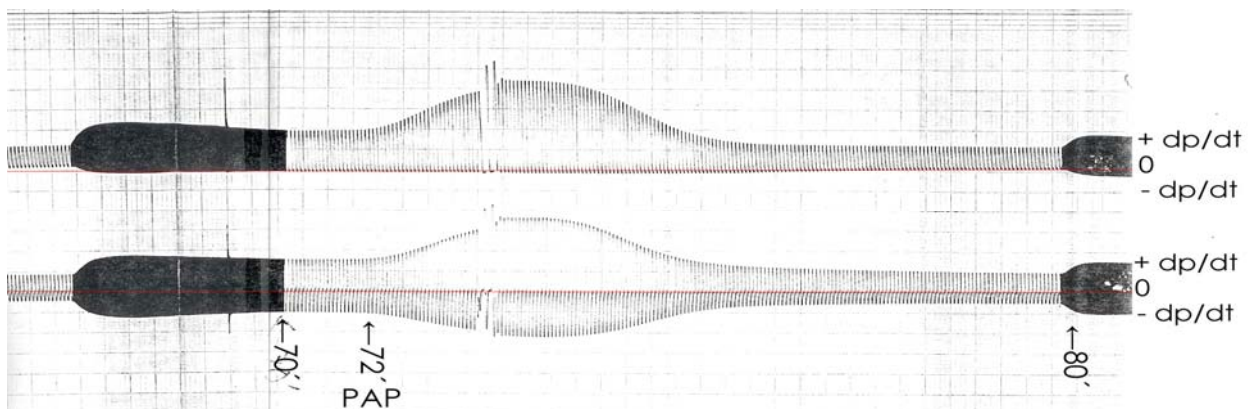


Abbildung 9 (Fortsetzung)

4.7 Linksventrikulärer Stoffwechselstatus

Für keinen der untersuchten Parameter des linksventrikulären Stoffwechselstatus ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und SOD-Gruppe (Abbildung 10, Tabelle 11a + b).

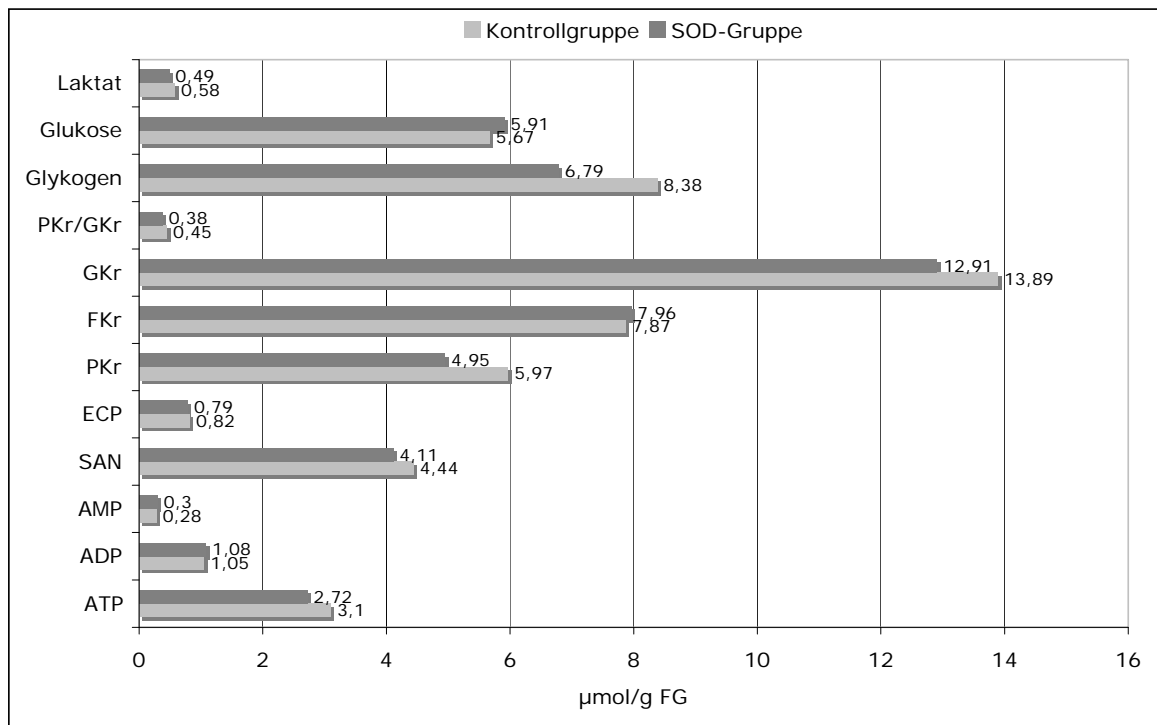


Abbildung 10: Parameter des linksventrikulären Stoffwechselstatus in der Kontroll- und der SOD-Gruppe

ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, AMP = Adenosinmonophosphat, SAN = Summe der Adenindinukleotide, ECP = Energy Charge Potential, PKr = Phosphokreatin, FKr = Freies Kreatin, GKr = Gesamtkreatin

Ergebnisse

Tabelle 11a: Linksventrikulärer Stoffwechselstatus von Herzen der Kontroll- und SOD-Gruppe ($\mu\text{mol/g FG}$, $\bar{x} \pm s$)
 ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, AMP = Adenosinmonophosphat, SAN = Summe der Adenindinukleotide, ECP = Energy Charge Potential

Vers.-Nr.:	ATP	ADP	AMP	SAN	ECP
Kontrollgruppe					
8066					
8068	4,02	0,89	0,13	5,04	0,886
8070	3,45	0,87	0,10	4,42	0,879
8074	3,01	1,15	0,23	4,39	0,817
8083	3,37	1,12	0,10	4,59	0,856
8084	3,19	1,11	0,16	4,46	0,840
8085	3,22	1,09	0,22	4,53	0,831
8095	2,29	0,86	0,53	3,68	0,739
8099	2,78	1,00	0,40	4,18	0,785
8102	2,57	1,39	0,69	4,65	0,702
$\bar{x} \pm s$	$3,10 \pm 0,51$	$1,05 \pm 0,17$	$0,28 \pm 0,21$	$4,44 \pm 0,37$	$0,820 \pm 0,06$
SOD-Gruppe					
8078	2,85	0,84	0,10	3,82	0,864
8079	2,85	0,91	0,18	3,94	0,839
8082	3,20	1,16	0,11	4,47	0,846
8092	2,72	1,19	0,54	4,45	0,745
8093					
8096	2,75	0,97	0,35	4,07	0,795
8097	2,90	1,42	0,25	4,57	0,790
8098	2,92	1,21	0,34	4,47	0,789
8100	2,05	1,08	0,47	3,60	0,719
8103	2,25	0,98	0,39	3,62	0,757
$\bar{x} \pm s$	$2,72 \pm 0,35$	$1,08 \pm 0,18$	$0,30 \pm 0,15$	$4,11 \pm 0,39$	$0,790 \pm 0,05$

Ergebnisse

Tabelle 11b: Linksventrikulärer Stoffwechselstatus von Herzen der Kontroll- und SOD-Gruppe ($\mu\text{mol/g FG}$, $\bar{x} \pm s$)

PKr = Phosphokreatin, FKr = Freies Kreatin, GKr = Gesamtkreatin

V,-Nr.:	PKr	FKr	GKr	PKr/GKr	Glykogen	Glukose	Laktat
Kontrollgruppe							
8066							
8068	8,11	6,50	14,61	0,555	10,27	5,83	0,57
8070	7,85	8,51	16,36	0,480	6,10	6,47	0,49
8074	5,72	8,68	14,40	0,397	8,85	6,01	0,43
8083	6,34	7,92	14,76	0,463	12,46	5,10	0,86
8084	4,79	7,27	12,06	0,397	12,96	5,58	0
8085	6,72	5,26	11,98	0,561	10,64	5,63	0,25
8095	5,08	9,43	14,51	0,350	4,31	5,95	1,43
8099	5,31	7,67	12,98	0,409	3,04	5,75	0,50
8102	3,81	9,57	13,38	0,285	6,78	4,68	0,71
\bar{x}	5,97	7,87	13,89	0,450	8,38	5,67	0,58
s	$\pm 1,42$	$\pm 1,39$	$\pm 1,42$	$\pm 0,080$	$\pm 3,52$	$\pm 0,52$	$\pm 0,40$
SOD-Gruppe							
8078	6,10	6,25	12,35	0,494	5,23	5,86	0
8079	4,28	7,56	11,84	0,361	4,28	5,41	0,86
8082	5,00	6,88	11,88	0,421	9,18	6,05	0,85
8092	4,95	7,99	12,94	0,383	6,26	5,79	0,16
8093							
8096	5,82	8,02	13,84	0,421	10,31	5,58	0,53
8097	5,41	9,87	15,28	0,354	7,01	5,68	0,37
8098	5,04	8,64	13,68	0,368	7,37	6,02	0,62
8100	3,86	8,50	12,36	0,312	5,17	6,23	1,06
8103	4,05	7,93	11,98	0,338	6,28	6,60	0
\bar{x}	4,95	7,96	12,91	0,380	6,79	5,91	0,49
s	$\pm 0,77$	$\pm 1,04$	$\pm 1,16$	$\pm 0,05$	$\pm 1,95$	$\pm 0,36$	$\pm 0,39$

5 Diskussion

5.1 Methodik

Die Ratte hat sich als Versuchstier für experimentelle Studien, insbesondere am isolierten Herzen, bewährt. Zudem ist sie auf Grund der Verfügbarkeit einer Vielzahl von Vergleichsdaten sowie ihrer unproblematischen und preiswerten Haltung für derartige Untersuchungen bestens geeignet. Die standardisierten Zucht- und Haltungsbedingungen erlauben eine Reduktion der Zahl der Versuchstiere. Trotz der Unterschiede in einigen biologischen Parametern wie beispielsweise der Herzfrequenz oder der Kortikoid-Produktion bestehen keine prinzipiellen Unterschiede zu anderen Säugern (HAVENAAR et al. 1995). Unter den vorliegenden Bedingungen der Organisolierung sind einfache und reproduzierbare Experimente möglich, um aussagekräftige Resultate zu erreichen.

Seit der Erstbeschreibung wurde die Langendorff-Methode bei vielen Spezies (u.a. Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte und Hamster) angewendet (ALMOTREFI und BAKER 1980; JANSE und WILMS-SCHOPMAN 1982; DALY et al. 1984; HEARSE et al. 1986; ANDERSON et al. 1987; TSAO et al. 1992; MARBER et al. 1993; BELLEMIN-BAURREAU et al. 1994; TANGUAY et al. 1995). Sie gestattet, die Tätigkeit des aus dem Körper völlig isolierten Säugetierherzens einwandfrei zu untersuchen.

Die Vorteile mit kristalloiden Lösungen perfundierter, isolierter Herzpräparate sind die geringen Kosten, die Einfachheit der Herstellung und das Fehlen von Gerinnungsproblemen. Im Gegensatz zu mit Blut perfundierten Herzen entfällt die schwer durchführbare Standardisierung der Erythrozyten-, Granulozyten- und Thrombozytenzahl (DÖRING und DEHNERT 1985).

Nachteilig ist, dass das Herz von diesen notwendigen komplexen, funktionserhaltenden Vorgängen abgeschnitten ist. Die Perfusionslösungen enthalten meist nur Elektrolyte, Glukose und Insulin. Somit fehlen essentielle Substrate wie Aminosäuren, Laktat, Nukleotidvorstufen und Fettsäuren, die eine wichtige Rolle bei den Reperfusionsschäden spielen und an physiologischen Prozessen, wie der Regulierung des onkotischen Drucks, des Sauerstoffpartialdrucks und der Koronardurchströmung beteiligt sind. Ne-

ben der Verlängerung der Diffusionswege verschlechtern sich über die Zeit in einem solchen Modell auch die hämodynamischen Funktionen. Diese Veränderungen treten aber sowohl bei der Kontroll- wie auch bei der Versuchsgruppe auf.

Für die vorliegende Untersuchung wurde eine Modifikation der ursprünglich 1932 von Krebs und Henseleit eingeführten Bicarbonat-Puffer-Lösung (KREBS und HENSELEIT 1932) verwendet. Diese Lösung, in der Gewebe für längere Zeit überleben und funktionstüchtig bleiben kann, wurde durch Zugabe von Ca-EDTA verbessert. Als Komplexbildner mit Metallionen soll Ca-EDTA die Entstehung freier Radikale verhindern (NEELY et al. 1967). Der Zusatz von Glukose dient einer optimierten Energiebereitstellung (HEARSE und CHAIN 1972). Die Lösung wird gemäß der Erfahrungen von Robinson et al. vor der Anwendung filtriert, um darin enthaltene ungelöste Verunreinigungen, die die Kapillaren verstopfen könnten, zu entfernen (ROBINSON et al. 1983, 1984).

Nach seiner Entnahme wird das Herz durch die Art der Perfusion gewissermaßen unphysiologischen Bedingungen ausgesetzt: Die gesamte Versorgungslage des Herzens ist dergestalt verändert, dass beispielsweise mit Ausnahme von Glukose so wesentliche Komponenten wie Aminosäuren, Nukleotidvorstufen, Fettsäuren oder Laktat dem Perfusat nicht zugeführt werden. Darüber hinaus kann es bei langer Perfusionsdauer mit kristalloiden Lösungen wie z.B. der Krebs-Henseleit-Lösung zur Ödembildung und folglich zu Beeinflussungen des Koronarflusses sowie der Mikrozirkulation kommen (FUKUSE et al. 1995). Neben der Verlängerung der Diffusionswege verschlechtern sich in einem solchen Modell über die Zeit auch die hämodynamischen Funktionen. Alle diese modellabhängigen Veränderungen des Organs müssen durch Kontrollgruppen, die in Vorversuchen untersucht wurden, simuliert werden.

Außer der durch die Koronarien fließenden Flüssigkeit tropft vom Herzen immer eine kleine Flüssigkeitsmenge ab, die Parafluss genannt wird. Zur Entstehung des Paraflusses gibt es verschiedene Möglichkeiten.

1. Verlust durch die Thebesischen Venen: Die Thebesischen Venen (MOIR et al. 1964) sind kleine Äste aus der A. coronaria communis sinistra, die venöses Blut in das linke Atrium und auch in den linken Ventrikel leiten. Von dort kann die Perfusionsflüssigkeit neben dem Ballon abfließen. Die Menge entspricht laut Moir aber nur 2% des Flusses

in der A. coronaria communis sinistra. Sie ist nach RUBANYI und KOVACH zwar dem Perfusionsdruck linear, könnte also am Ende des Versuches mit sinkenden Perfusionsdruck geringer werden beziehungsweise während der auf Acetylcholin oder Papaverin entstehenden kurzdauernden Drucksteigerung erhöht sein (RUBANYI und KOVACH 1980). Bei unseren Versuchen zeigte sich kein Unterschied zwischen Kontrollgruppe und SOD-Gruppe. Bei erhöhter Druckentwicklung durch Acetylcholin oder Papaverin sind die Veränderungen so gering, dass die Ergebnisse durch den Thebesienfluss nicht verfälscht werden.

2. Die Aortenklappe wird durch eine zu weit vorgeschobene Aortenkanüle oder den Perfusionsdruck insuffizient. Perfusat gelangt in den linken Ventrikel, wird durch den kontrahierenden Ventrikel am Ballon vorbei in den linken Vorhof gepresst und verlässt den Vorhof dort, wo der Ballon eingeführt wurde. Dieser Nebenfluss ist als belanglos zu betrachten, da er nicht durch das Koronargefäß läuft und somit nicht zum Koronarfluss zählt. Die venöse Probe wird somit nicht beeinträchtigt. 3. Auch Undichtigkeiten der Ligatur um die A. pulmonalis können den Parafluss steigern. Versuche, bei denen das Koronarfluss-Parafluss-Verhältnis zugunsten des Koronarflusses verändert ist, wurden von der Auswertung für die vorliegende Untersuchung ausgeschlossen.

Der Gehalt des Myokards an labilen energiereichen Verbindungen wie ATP und PKr verändert sich schon bei geringen Versorgungsstörungen, und darauf hin verschlechtert sich auch der Stoffwechselstatus deutlich. Daher muss dafür Sorge getragen werden, das Herz bei der Probengewinnung zu einem definierten Zeitpunkt schlagartig einzufrieren, um alle Stoffwechselprozesse gleichzeitig zu unterbrechen. Dies gewährleistet die Gefrierstoppmethode nach WOLLENBERGER, bei der das Herz mit einer vorgekühlten Zange rasch zu einer flachen Scheibe gequetscht wird (WOLLENBERGER et al. 1960).

Beendet werden die Versuche mittels der Gefrierstoppmethode nach WOLLENBERGER et al. (1960). Hierdurch wird die Kontaktfläche stark vergrößert und es tritt eine schnelle Abkühlung des Herzens beim Eintauchen in flüssigen Stickstoff ein. Würde man das 37°C warme Herz direkt in ein Gefäß mit flüssigem Stickstoff einbringen, käme es zur Bildung einer isolierten gekühlten Schicht um das weiterhin warme Innere der Probe („Leidenfrost-Phänomen“), die die Abkühlung des gesamten Organs stark verlangsamt.

Abschließend muss darauf hingewiesen werden, dass tierexperimentelle Vergleiche mit klinischen Befunden oft die pathologischen Veränderungen der Patientenherzen außer Acht lassen. Darüber hinaus gilt es ferner neben pathophysiologischen auch spezie-s-physiologische Aspekte zu berücksichtigen, z. B. die extrem hohe koronare Flussrate bei Rattenherzen. Daher ist eine kritische Betrachtungsweise dieser Modelle nötig und eine uneingeschränkte Übertragung der Erkenntnisse in die klinische Praxis nicht möglich.

Bei gebotener Vorsicht ist jedoch die Untersuchung an Kleintierherzen ein bewährtes Objekt für Screening-Untersuchungen von Fragestellungen zur Myokardprotektion, wie z. B. die an Rattenherzen entwickelte St. Thomas Hospital-Lösung, die von Hearse et al. in Versuchen am isolierten Rattenherzen entwickelt wurde (HEARSE et al. 1974) und breiten Eingang in die Herzchirurgie gefunden hat.

5.2 Myokardiale Wirkungen von Acetylcholin und Papaverin am präischämischen Herzen

Koronardilatatorisch wirkende Substanzen können in zwei Gruppen eingeteilt werden, die endothelabhängigen (Acetylcholin, ADP, Serotonin) und die auf die Gefäßmuskulatur wirkenden und endothelunabhängigen (Adenosin, NaNO₂, Papaverin, Nitroglycerin) Vasodilatoren (FORTH et al. 2001). In der vorliegenden Untersuchung wurden Papaverin und Acetylcholin verwendet, um die Ursache einer beobachteten Koronarflusssteigerung entweder als endothel-abhängig oder –unabhängig differenzieren zu können. Papaverin bewirkt durch die Hemmung der cAMP-spaltenden Phosphodiesterase eine Erhöhung des intrazellulären Gehalts an cAMP (zyklisches Adenosin-Monophosphat). Dadurch wird die glatte Gefäßmuskulatur ebenso wie bei erhöhtem intrazellulären Gehalt an cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat) relaxiert und es kommt zur Gefäßdilatation. Da eine rezeptorunabhängige direkte Relaxation der glatten Muskulatur auftritt, wird es als muskultropes Spasmolytikum auch im Bereich der Darm-, Bronchial-, Gallenwegs-, Harnwegs- und Uterus-Muskulatur eingesetzt. Die wichtigsten Nebenwirkungen sind Arrhythmien und Blutdruckabfall (WILSON und WHITE 1986; ZIJLSTRA et al. 1988).

Furchgott und Zawadzki wiesen 1980 erstmalig nach, dass die relaxierende Wirkung von Acetylcholin an isolierten aortalen Gefäßstreifen des Kaninchens von der Anwesenheit eines intakten Endothels abhängt. Sie postulierten einen endothelialen relaxierenden Faktor (EDRF) genannt (FURCHGOTT und ZAWADZKI 1980). Nach Entfernung des Endothels (mechanisch oder enzymatisch) wirkte Acetylcholin nicht mehr relaxierend. Die Freisetzung von EDRF aus dem Endothel war kalziumabhängig und konnte durch die Gabe des Kalziumionophors sehr effizient stimuliert werden.

Acetylcholin ist ein endothelabhängiger Vasodilatator. In den Endothelzellen entsteht der zunächst EDRF genannte Faktor, welcher später als NO identifiziert worden ist (IGNARRO et al. 1987; PALMER et al. 1987). Das in den Zellen normalerweise vorhandene Guanosintriphosphat (GTP) wird durch die NO-abhängige Guanylatzyklase zum muskelrelaxierenden zyklischen Guanosin-Monophosphat (cGMP) umgewandelt (BEAVO und BRUTON 2002; PILZ und CASTEEL 2003).

Es existieren mehrere Theorien darüber, wie das cGMP seine gefäßerweiternde Wirkung ausübt. Entweder besteht eine Verminderung des intrazellulären Ca^{++} -Einstroms in die Zelle oder ein vermehrter Verlust aus der Zelle. Ein vermehrter Verlust könnte durch die Aktivierung einer Proteinkinase bewerkstelligt werden, die den Ca^{++} -Ausstrom über Ca^{++} -ATPase stimuliert. Eine weitere mögliche Wirkungsweise ist die Aktivierung einer Proteinkinase, die die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Myosinketten beeinflusst (IGNARRO et al. 1987).

Acetylcholin zeigt an menschlichen Koronararterien mindestens drei Wirkkomponenten. Es kann zu einer ausgeprägten direkten Vasokonstriktion der glatten Muskulatur, daneben aber auch zu einer (geringen) Freisetzung von EDRF und Prostazyklin führen. Der zu beobachtende Summeneffekt ist meist eine Vasokonstriktion, seltener sieht man eine geringe Dilatation durch Überwiegen der relaxierenden Mechanismen (KELM et al. 1991). In vivo werden die Versuchsbedingungen noch dadurch kompliziert, dass intrakoronar appliziertes Acetylcholin bei Anwesenheit eines normalen Endothels immer zu einer Dilatation der koronaren Widerstandsgefäße führt und so den Koronarfluss erhöht. Dies führt zu einer zusätzlichen flussabhängigen, endothelvermittelten Dilatation an den epikardialen Koronargefäßen. Bei Patienten mit angiographisch unauffälligen Herzkranzgefäßen bewirkt die intrakoronare Applikation von Acetylcholin dann eine Vasodilatation der epikardialen Gefäße, dagegen wird bei Patienten mit ei-

ner koronaren Herzkrankheit häufig eine (paradoxe) Vasokonstriktion beobachtet, was auf eine Abschwächung des fluss- und rezeptorvermittelten endothelialen Relaxationsmechanismus bei bestehender Endotheldysfunktion schließen lässt (FÖRSTERMANN 1991).

In der vorliegenden Untersuchung zeigten alle isoliert perfundierten Rattenherzen sowohl auf Acetylcholin- als auch auf Papaverin-Applikation eine reversible Steigerung des Koronarflusses. Dies deutet darauf hin, dass die Erhaltung der myokardialen Funktion durch die vorgenommenen operativen Prozeduren einschließlich der Exkorporation gewährleistet war. Bereits in zahlreichen Studien hat sich die hier angewendete Methode der Anwendung der Langendorff-Apparatur zur Imitierung physiologischer Vorgänge bei exkorpiertem Herzen unter Ausschaltung des übrigen Organismus bewährt (ALMOTREFI und BAKER 1980; JANSE und WILMS-SCHOPMAN 1982; DALY et al. 1984; HEARSE et al. 1986; ANDERSON et al. 1987; TSAO et al. 1992; MARBER et al. 1993; BELLEMIN-BAURREAU et al. 1994; TANGUAY et al. 1995).

5.3 Auswirkungen von Acetylcholin und Papaverin während der Reperfusion bei Herzen mit und ohne Superoxiddismutase-Behandlung

In der vorliegenden Untersuchung reagierten die Rattenherzen im Anschluss an eine 20minütige Ischämie in der beginnenden Reperfusion mit Krebs-Henseleit-Lösung in Abhängigkeit von einer zusätzlichen Superoxiddismutase-Applikation nicht mehr gleichförmig auf die Gabe von Acetylcholin und Papaverin. Die mit Superoxiddismutase behandelten Herzen (SOD-Gruppe) zeigten – wie vor der Ischämie – eine statistisch signifikante Steigerung des Koronarflusses, die bei der Kontrollgruppe, die kein SOD erhalten hatte, ausblieb. In beiden Gruppen verlief die postischämische Reaktion auf Papaverin gleichartig zu der präischämischen. Diese Ergebnisse belegen einerseits, dass im Rahmen der Ischämie eine Schädigung des Endothels stattgefunden hat, da der endothelabhängige Vasodilatator Acetylcholin in der Kontrollgruppe keine Wirksamkeit entfalten konnte, wie das Ausbleiben der Koronarflussteigerung zeigt. Die nach wie vor vorhandene Reagibilität auf Papaverin deutet darauf hin, dass es nicht um eine unspezifische Empfindlichkeitsverminderung handelt.

In Untersuchungen an Hunden mit Hilfe des „Open-Heart“-Modells stellten Mehta und Mitarbeiter fest, dass nach einstündiger Ischämie und Reperfusion die Reaktion auf Acetylcholin – gemessen am Koronarfluss – herabgesetzt ist. Als Ursache hierfür sehen sie eine Neutrophilen-Akkumulierung an, die den Koronarfluss behindert, zumal dieser auch durch Kalziumblockade nicht gefördert werden konnte (MEHTA et al. 1989a; MEHTA et al. 1989b).

Die zellulären Reaktionen auf eine myokardiale Ischämie und Reperfusion beinhalten umfangreiche Veränderungen, die folgendermaßen zusammengefasst werden können (HEARSE et al. 1978; TAEGTMEYER 1994; LÖFFLER und PETRIDIS 2003): Erhöhung der Calciumkonzentration im Zytosol, Entkopplung und Hemmung des Elektronentransports, Verringerung der mitochondrialen ATPase-Aktivität, Verlust der antioxidativen Abwehr, Verlust von mitochondrialen und zytosolischen Enzymen, Verlust von Glykogen und essentiellen Stoffwechselmetaboliten des Zitronensäurezyklus, intrazelluläre Anhäufung freier Fettsäuren. Die Folgen dieser zellulären Veränderungen für die Myokardfunktion wurden in zahlreichen experimentellen Studien nachgewiesen: verminderte Pumpfunktion (HAIDER 1975; LIEDTKE et al. 1978), Arrhythmien (KURIEN et al. 1971), AV-Block (OPIE 1972), Kammerflimmern (OLIVER 1972), verminderte Herzleistung (HENDERSON et al. 1980), verminderter Koronarfluss (SEVEREID et al. 1969; ROGERS et al. 1977; MANTLE et al. 1981) bis hin zum Herzstillstand (HOAK et al. 1964).

Es mehren sich die Anzeichen dafür, dass die oben beschriebene Kaskade der Endothelschädigung mit ihren Folgen durch ein Übermaß an freien Radikalen ausgelöst wird. Marczin und Mitarbeiter vertreten die Auffassung, dass Ischämie und Reperfusion durch einen signifikanten oxidativen Stress und typische Veränderungen der oxidativen Schutzfunktionen charakterisiert sind (MARCZIN et al. 2003).

Während zunächst die Myokardzelle selbst als Entstehungsort freier Radikale angesehen wurde (BURTON et al. 1984; ROSEN und FREEMAN 1984; RUBANYI 1988), geht man heute eher vom Kapillarendothel als Ursprungsort aus (ARROYO et al. 1990; BABBS et al. 1992; ZWEIER et al. 1994). Im Herzen wird durch ischämische Zustände eine Adenosintriphosphat-(ATP)-Dephosphorylierung verursacht, wobei Adenosindiphosphat (ADP), Adenosinmonophosphat (AMP) und Adenosin entstehen. Das Adenosin diffundiert aus der Zelle, im Interstitium entsteht aus ihm Hypoxanthin und Xanthin.

Im Endothel der Kapillaren ist das Enzym Xanthin-Dehydrogenase vorhanden (INAUEN et al. 1989; WARD 1991; KUROSE und GRANGER 1994). Unter ischämischen Umständen ist der Kalzium-Influx erhöht. Dadurch wird ein proteolytisches Enzym aktiviert und die Xanthin-Dehydrogenase einer proteolytischen Spaltung unterworfen. Es entsteht die Xanthin-Oxidase. Xanthin-Oxidase katalysiert die irreversible Umwandlung von Xanthin zu Harnsäure. Der Elektronen-Akzeptor für diese Reaktion ist Sauerstoff, wobei das Radikal Superoxid gebildet wird. Die Umwandlung des Enzyms Xanthin-Dehydrogenase in Xanthin-Oxidase kann auch an isolierten Organen als Produktionsquelle von freien Sauerstoff-Radikalen dienen (SCHULZ et al. 2004).

Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass Superoxide die Hauptverursacher in der Folge Ischämie-/Reperfusion-bedingter Schäden sind (BECKMAN et al. 1990; FREEMAN et al. 1995; YOSHIDA et al. 2000). Daher gilt der Superoxiddismutase als antioxidativem Enzym mit hohen Reaktionsraten bei der Superoxideliminierung besonderes wissenschaftliches Interesse.

Antioxidative Substanzen können in zwei Kategorien eingeteilt werden: nicht-enzymatische Radikalfänger („Scavenger“) und antioxidative Enzyme. Während es sich bei den nicht-enzymatischen Radikalfängern, wie beispielsweise Vitamin E, um kleine Moleküle handelt, die rasch von den freien Radikalen verbraucht werden, werden die Enzyme nicht konsumiert und besitzen eine hohe Affinität und Reaktionsrate mit ROS (MUZYKANTOV 2001).

Das Enzym Superoxiddismutase kommt bei Säugetieren und beim Menschen in drei Isoformen vor (FRIDOVICH 1995): Die Cu-Zn-Superoxiddismutase wird konstitutiv exprimiert und kommt im Zytosol vor, die Mn-Superoxiddismutase herrscht in Mitochondrien vor und die extrazelluläre Superoxiddismutase ist auf der Oberfläche der Plasmamembran lokalisiert (KARLSSON und MARKLUND 1988). Alle drei Formen konvertieren das Superoxid-Anion in H_2O_2 , welches seinerseits durch das Enzym Katalase zu Wasser und Sauerstoff abgebaut wird (FRIDOVICH 1978, 1995).

Versuche mit SOD-defizienten Mäusen zeigten, dass diese Tiere gegenüber einer Ischämie/Reperfusion besonders empfindlich sind (YOSHIDA et al. 2000; ASIMAKIS et al. 2002).

In der vorliegenden Untersuchung blieb in der Reperfusionsphase in der Gruppe von Herzen, denen Superoxiddismutase appliziert wurde, die vasodilatatorische Wirkung von Acetylcholin erhalten, die in der Kontrollgruppe ohne SOD ausblieb. Dies zeigt, dass unter den hier gewählten Versuchsbedingungen die Superoxiddismutase-Applikation wirksam vor ischämie-/reperfusionsbedingten Endothelschäden schützen konnte.

Im Hinblick auf die Fähigkeit der Superoxiddismutase, effektiv freie Radikale zu binden und hierdurch einen Ischämie-/Reperfusionsschaden zu mindern, wurden zahlreiche tierexperimentelle in vivo-Studien durchgeführt. Auch in vivo reduziert eine Superoxiddismutase-Applikation wirksam die negativen Auswirkungen von Infarkten: beim Hund (JOLLY et al. 1984; WERNS et al. 1985; AMBROSIO et al. 1986), beim Schwein (DAS et al. 1986; OTANI et al. 1986), beim Kaninchen (GRILL et al. 1992) und bei der Ratte (PETTY et al. 1994). Weitere Forschungen verliefen allerdings widersprüchlich. OMAR et al. fanden heraus, dass bei hohen Superoxiddismutase-Dosen die Wirksamkeit der Kardioprotektion abnimmt (OMAR et al. 1990). Die Arbeitsgruppe KLONER stellte keine Wirksamkeit bei der Behandlung von Reperfusionsschäden im in vivo-Hundemodell fest (KLONER 1993). Gleiches gilt für ein in vivo-Pavianmodell, bei dem Superoxiddismutase nach dem Beginn der Ischämie und vor dem Einsetzen der Reperfusion verabreicht wurde (WATANABE et al. 1993). In einer multizentrischen, randomisierten, placebokontrollierten Studie wurde geprüft, ob ein Reperfusionsschaden verhindert werden kann, wenn Patienten vor einer perkutanen transluminalen Koronarangioplastik intravenös Superoxiddismutase verabreicht wird. Hier fand sich bei Patienten die mit humaner rekombinanter Superoxiddismutase behandelt wurden, keine Verbesserung der linksventrikulären Funktionen im Vergleich zu nicht behandelten Patienten (FLAHERTY et al. 1994).

Widersprüchliche Ergebnisse experimenteller Studien bezüglich einer Schutzfunktion von antioxidativen Substanzen zur Behandlung der myocardialen Ischämie und Reperfusion können verschiedene Ursachen haben, die meist in unterschiedlichen Versuchsbedingungen zu sehen sind: Versuchstierspezies, Ausmaß des kollateralen Blutflusses, Dauer der Ischämie, Zeitpunkt der Substanzverabreichung, Methode der Substanzfreisetzung und verschiedene Endpunkte der Kardioprotektion. Außerdem ist es schwierig, sicherzustellen, dass die verabreichten Präparate nur ein bestimmtes antioxidatives System beeinflussen, zumal es sehr wahrscheinlich ist, dass antioxidative

Regulierungen zeitlich gestaffelt ablaufen (HARAMAKI et al. 1998; KANG 1999; MARCZIN et al. 2003).

Basierend auf der unbestreitbaren Tatsache, dass Superoxiddismutase im Versuchstiermodell vielfach – wie auch in der vorliegenden Untersuchung – ihre Eignung zur Behandlung von Reperfusionsschäden gezeigt hat, erscheinen weitergehende Studien erforderlich und sinnvoll. Diese sollten unter konsistenten Versuchsbedingungen durchgeführt werden, die sich eng an der klinischen Situation des beabsichtigten Behandlungsziel orientieren.

5.4 Herzmechanik

Es ist ein Anliegen einer Vielzahl von Studien über myokardiale Ischämie und postischämische Erholung, die myokardiale Herzfunktion und Überlebensfähigkeit nach einer ischämischen Belastung zu verbessern (KRAUSE et al. 1986; FLAMENG 1995; MENASCHE 1997; MCFALLS et al. 2003; CARREIRA et al. 2005). Im Rahmen derartiger Untersuchungen reicht es nicht aus, ausschließlich biochemische Parameter, als Ausdruck des metabolischen Zustandes des Myokards, zur Beurteilung der Qualität der Myokardprotektion und des Ausmaßes der Erholung heranzuziehen. Insbesondere mit Blick auf die klinische Praxis ist es notwendig, herzmechanische Parameter mit einzubeziehen, um die Effektivität der Myokardprotektion und therapeutischer Maßnahmen zu überprüfen. Die Berücksichtigung dieser herzmechanischen Parameter ist auch insofern von Bedeutung, als nach Ansicht vieler Autoren der metabolische Status der Zelle beziehungsweise des Organs nicht unbedingt Aussagen über die Funktionsfähigkeit zulässt (KLEIN et al. 1986; ROSENKRANZ et al. 1986; ISSELHARD 1988; SCHULTHEISS 1992).

Eine Möglichkeit zur Beurteilung der Herzfunktion im Langendorff-Modell stellt die isovolumetrische Messung des maximalen linksventrikulären systolischen Druckes (LVD) sowie der linksventrikulären Parameter Druckanstieg- und Druckabfallgeschwindigkeit ($+dp/dt_{max}$, $-dp/dt_{max}$) dar (JACOB und WEIGAND 1966). Der Vorteil der Bestimmung dieser Parameter in einem ex vivo-Modell liegt darin, dass verschiedene ekstrakardiale Faktoren, die die Beurteilung des kontraktile Zustands des Myokards in vivo beeinflussen, nicht vorhanden sind. So kann die Herzfunktion über die erste Ableitung

der Zeit (+dp/dt und -dp/dt) durch Festsetzung der Herzfrequenz und den „pre- und afterload“ bestimmt werden (RUTISHAUSER und KRAYENBÜHL 1968; WEISFELDT et al. 1974).

Die Anwendbarkeit von LVD sowie der Druckanstiegs- und Druckabfallgeschwindigkeiten zur Beurteilung von Veränderungen der Kontraktilität ist nach Aussage einiger Autoren an bestimmten Bedingungen geknüpft (REEVES und HEFNER 1962; MASON 1969; MORGENSTERN et al. 1970; MORGENSTERN et al. 1972; STRAUER 1973; BORCHARD et al. 1980; DÖRING und DEHNERT 1985):

- Das Maximum von dp/dt muss vor der Öffnung der Aortenklappe erreicht sein, um den Einfluss der Nachbelastung („after-load“) konstant zu halten.
- Die Herzfrequenz muss konstant sein.
- Der enddiastolische Druck und der koronare Perfusionsdruck müssen konstant sein, damit dp/dtmax auf eine definierte Ausgangslage bezogen werden kann.

In der vorliegenden Untersuchung deutet die Tatsache, dass der maximale linksventrikuläre Druck und die maximale linksventrikuläre Druckanstiegs- und Druckabfallgeschwindigkeit nach der Ischämie (abgesehen von einer allmählichen Verlangsamung) erhalten bleiben, die Koronarflusserhöhung auf Acetylcholin aber ausbleibt, darauf hin, dass das Endothel empfindlicher reagiert als das Myokard. Dies bedeutet, dass die Untersuchung des Koronarflusses einen aussagekräftigeren Parameter im Hinblick auf die Feststellung von Endothelschäden darstellt als die Ermittlung der linksventrikulären Herzmechanikparameter.

5.5 Stoffwechselparameter

Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen am isoliert perfundierten Rattenherzen zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen SOD und Kontrolle bezüglich zahlreicher erhobener Stoffwechselparameter. Diese Faktoren wurden aufgrund der Annahme bestimmt, dass sich ein ischämiebedingtes Energiedefizit durch Änderungen der Laborparameter belegen lässt.

Bezogen auf den Metabolismus des Herzmuskels äußert sich das ischämische Energiedefizit nach einem kurzen Intervall ungestörter Funktion zuerst im Abbau des Phosphokreatins mit Funktionseinbußen bei zunächst unverändertem Adeninnukleotidgehalt. Bei Fortbestehen der ischämischen Bedingungen wird das ATP-Reservoir verkleinert, wobei in Abhängigkeit von den Bedingungen die Gewebegehalte an ADP und AMP ansteigen können und der Gesamtadeninnukleotidgehalt (SAN) unverändert bleibt. Später sinkt der SAN durch den Abbau von Nukleotiden zu Nukleosiden (ISSELHARD 1960; ISSELHARD et al. 1964; ISSELHARD 1965). Daher können die Metabolite des Adenylsäure-Kreatinphosphat-Systems als Marker für den Energiestatus des Herzens verwendet werden (ISSELHARD und MERGUET 1962; ISSELHARD et al. 1964; ISSELHARD 1965; BRETSCHEIDER et al. 1975). Einen weiteren Parameter zur Beurteilung des myokardialen Energiestatus soll das „energy charge potential (ECP)“ darstellen (ATKINSON 1968), in welches außer dem SAN die aktuellen ATP- und ATP-Konzentrationen einfließen. Denn laut NAGEL sind die alleinigen Gewebskonzentrationen des ATP und des Phosphokreatin nur von eingeschränkter Aussagekraft (NAGEL 1970). Es sei wichtig, den Umsatz und den Transport von den Mitochondrien zu den energieverbrauchenden Strukturen, wie beispielsweise den Myofibrillen, zu berücksichtigen. Trotzdem nehmen einige Autoren Alterationen der Gewebespiegel energiereicher Phosphate als Maßstab für die Erholungsfähigkeit des Myokards nach Wiedereinsetzen der Energieversorgung (KÜBLER und SPIECKERMANN 1970; HEARSE und CHAIN 1972; HEARSE et al. 1978).

Leider spiegelten die in der vorliegenden Untersuchung erhobenen Befunde die erwarteten Änderungen insbesondere im Stoffwechsel der energiereichen Phosphate nicht wider. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Ansicht vieler Autoren, dass der metabolische Status der Zelle, beziehungsweise des Organs, nicht unbedingt Aussagen über

die Funktionsfähigkeit zulässt (KLEIN et al. 1986; ROSENKRANZ et al. 1986; ISSELHARD 1988; SCHULTHEISS 1992). Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass auch bei anderweitig nachgewiesenen ischämischen Schäden nicht zwingend Abweichungen der Stoffwechselfparameter nachweisbar sein müssen.

5.6 Schlussfolgerungen

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung können folgende Schlüsse gezogen werden:

1. Die endotheliale Auskleidung des Herzens zeigt nach einer zwanzigminütigen Ischämie einen deutlichen Funktionsabfall.
2. Das Endothel reagiert im Vergleich zum Myokard sensibler auf eine Ischämie.
3. Acetylcholin wirkt als Vasodilatator an Langendorff-Herzen.
4. Papaverin wirkt als Vasodilatator auf die Muskulatur der Herzgefäße.
5. Unter der Behandlung mit Superoxiddismutase kann der Funktionsabfall des Endothels stark eingeschränkt werden.
6. In beiden Versuchsgruppen wurde kein messbarer Unterschied bezüglich der Stoffwechselparameter nachgewiesen.
7. Es besteht kein zwingender Zusammenhang zwischen dem Stoffwechselstatus des Myokards und der herzmechanischen Funktion.
8. Für die klinische Praxis der Herzchirurgie ergibt sich daraus keine Notwendigkeit, zur Beurteilung von myokardprotektiven Maßnahmen oder dem Ausmaß der postischämischen Erholung, sowohl quantitative Bestimmungen von Metaboliten, als auch herzmechanische Parameter, wie zum Beispiel den linksventrikulären Druck, heranzuziehen.
9. Unter der Einschränkung, dass die vorliegenden Resultate am tierexperimentellen Modell gewonnen wurden, ergibt sich die Empfehlung, dass in der Herzchirurgie nach induziertem Herzstillstand eine kontinuierliche Behandlung mit Superoxiddismutase sinnvoll sein kann, um eine bessere und schnellere metabolische und funktionelle Erholung zu erreichen.

6 Zusammenfassung

In Versuchen an isolierten Rattenherzen wurde den Fragen nachgegangen, ob nach einer kurzzeitigen Ischämie Endothelschäden nachweisbar sind und ob diese durch die Gabe von Superoxiddismutase verringert werden können.

Die Herzen von 20 männlichen Wistarratten (250-280 g Körpergewicht) wurden in Narkose exkorporiert und in eine modifizierte Langendorff-Apparatur überführt. Die Herzen wurden zunächst 35 min bei 37°C mit Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert, anschließend für 20 min bei 37°C einer kompletten globalen Ischämie ausgesetzt und schließlich für 25 min bei 37°C reperfundiert. Die Perfusions- und Reperfusiondrücke betrugen jeweils 75 mmHg. Zur Prüfung der Endothelfunktion wurden der endothelunspezifische Vasodilatator Papaverin (PAP) und der endothelspezifische Vasodilatator Acetylcholin (ACh) eingesetzt.

Die Hälfte der Herzen erhielt ab Beginn der Reperfusion insgesamt 2 ml bovine Superoxiddismutase (SOD-Gruppe), die übrigen zehn Herzen blieben unbehandelt (Kontrollgruppe). Neben dem Koronarfluss und Messgrößen der Herzmechanik (maximaler linksventrikulärer Druck LVDmax, maximale Druckerhöhungs- und Druckabfallgeschwindigkeit $+dp/dt_{max}$ und $-dp/dt_{max}$) wurden Parameter des ventrikulären Stoffwechsels und hieraus errechnete Größen bestimmt (ATP, ADP, AMP, Phosphokreatin, freies Kreatin, Glycogen, Laktat, Summe der Adeninnukleotide, Gesamtkreatin, Quotient Phosphokreatin/Gesamtkreatin, Energy Charge Potential).

Beide Versuchsgruppen reagierten präischämisch auf die Gabe der Vasodilatoren Acetylcholin und Papaverin mit einem statistisch signifikanten Anstieg des Koronarflusses. Postischämisch reagierten nur die mit Superoxiddismutase behandelten Herzen während der Reperfusion auf Acetylcholin mit einer Steigerung des Koronarflusses, während die Kontrollgruppe (ohne SOD) keine Reaktion auf eine erneute Acetylcholingabe zeigte. Auf Papaverin reagierten beide Gruppen ähnlich wie vor der Ischämie. Die Befunde deuten auch darauf hin, dass die mechanische Tätigkeit des Endothels durch eine Ischämie von 20minütiger Dauer deutlich negativ beeinflusst wird.

Bezüglich der Herzmechanik zeigten sich in beiden Versuchsgruppen sowohl post- als auch präischämisch statistisch signifikante Anstiege der Parameter LVDmax und +/-

dp/dt_{max} als Reaktion auf die Gabe von Acetylcholin und Papaverin, die durch die SOD-Applikation nicht unterbunden werden konnten.

Die Tatsache, dass der maximale linksventrikuläre Druck und die maximale linksventrikuläre Druckanstiegs- und Druckabfallgeschwindigkeit nach der Ischämie erhalten bleiben, die Koronarflusserhöhung auf Acetylcholin aber fehlt, deutet darauf hin, dass das Endothel empfindlicher reagiert als das Myokard.

In beiden Versuchsgruppen zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der erhobenen Stoffwechselparameter.

7 Summary

Kellerwessel, Elisabeth (2008): Endothelial and Myocardial Function in Isolated Rat Hearts after Short-time Ischemia, Influenced by Superoxide Dismutase.

By means of trials with isolated rat hearts we examined if an endothelium damage is detectable after short-time ischemia and if it can be reduced by an superoxide dismutase application.

The hearts of 20 male Wistar rats (body weight: 250-280 g) were excorpatated under anesthesia and transferred into a modified Langendorff apparatus. At first, the hearts were perfused with Krebs-Henseleit solution for 35 min at 37°C, then exposed to a complete global ischemia for 25 min at 37°C and finally reperfused for 20 min at 37°. The perfusion/reperfusion pressure was 75 mm Hg. For examining the endothelial function we chose the endothelium-unspecific vasodilatator papaverine (PAP) and the endothelium-specific vasodilatator acetylcholine (ACh).

At the beginning of reperfusion half of the hearts got a total of 2 ml bovine superoxide dismutase (SOD group), the remaining ten hearts remained untreated (control group). Beside coronary flow and indicators of heart mechanics (maximal left ventricular pressure LVDmax, maximal positive/negative pressure development \pm -dp/dtmax) we measured parameters of ventricular metabolism and resulting factors (ATP, ADP, AMP, phosphocreatine, free creatine, glycogen, lactate, sum of adenonucleotids, total creatine, phosphocreatine/total creatine ratio, energy charge potential).

Before ischemia both groups responded to the application of the vasodilators acetylcholine and papaverine by a statistically significant increase of coronary flow. After ischemia, during reperfusion, the hearts treated with superoxide dismutase, but not the control group, reacted to acetylcholine by an increasing coronary flow. To papaverine both groups responded similar as before ischemia. This results show that the mechanical endothelial function is strongly affected adversely by an ischemia lasting for 20 min.

Summary

Concerning heart mechanics, both groups showed a statistically significant increase of LVDmax and $\pm dp/dt_{max}$ as response to acetylcholine and papaverine which could not be inhibited by superoxide dismutase application.

The fact that LVDmax and $\pm dp/dt_{max}$ remain stable after ischemia while there is no increase in coronary flow, implies that the endothelium reacts more sensitive than the myocardium.

The measured metabolic parameters did not differ in both groups.

8 Literaturverzeichnis

- 1) ALMOTREFI, A. A., BAKER, J. B. (1980): The antifibrillatory potency of aprindine, mexiletine, tocainide and lignocaine compared on Langendorff-perfused hearts of rabbits and guinea-pigs. *J Pharm Pharmacol* 32: 746-50.
- 2) AMBROSIO, G., BECKER, L. C., HUTCHINS, G. M., WEISMAN, H. F., WEISFELDT, M. L. (1986): Reduction in experimental infarct size by recombinant human superoxide dismutase: Insights into pathophysiology of reperfusion injury. *Circulation* 74: 1424-1433.
- 3) ANDERSON, P. G., BISHOP, S. P., DIGERNESS, S. B. (1987): Transmural progression of morphologic changes during ischemic contracture and reperfusion in the normal and hypertrophied rat heart. *Am J Pathol* 129: 152-67.
- 4) ARROYO, C. M., CARMICHAEL, A. J., BOUSCAREL, B., LIANG, J. H., WEGLICKI, W. B. (1990): Endothelial cells as a source of oxygen-free radicals. An ESR study. *Free Radic Res Comm* 9: 287-296.
- 5) ASIMAKIS, G. K., LICK, S., PATTERSON, C. (2002): Postischemic recovery of contractile function is impaired in SOD2(+/-) but not SOD1(+/-) mouse hearts. *Circulation* 105: 981-986.
- 6) ATKINSON, D. E. (1968): The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 7: 4030-4034.
- 7) BABBS, C. F., CREGOR, M. D., BADYLAK, S. F. (1992): Histochemical demonstration of endothelial superoxid and hydrogen peroxide generation in ischaemic and reoxygenated rat tissues. *Cardiovasc Res* 26: 593-602.
- 8) BEAVO, J. A., BRUTON, L. L. (2002): Cyclic nucleotide research - still expanding after half a century. *Nature Reviews Mol Cell Biol* 3: 710-718.
- 9) BECKER, L. C., AMBROSIO, G. (1987): Myocardial consequences of reperfusion. *Progr Cardiovasc Dis* 30: 23-44.
- 10) BECKMAN, J. S., BECKMAN, T. W., CHEN, J., MARSHALL, P. A., FREEMAN, B. A. (1990): Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 1620-1624.
- 11) BELLEMIN-BAURREAU, J., POIZOT, A., HICKS, P. E., ARMSTRONG, J. M. (1994): An in vitro method for the evaluation of antiarrhythmic and antiischemic agents by using programmed electrical stimulation of rabbit heart. *J Pharmacol Toxicol Methods* 31: 31-40.
- 12) BINDOLI, A., CAVALLINI, L., RIGOBELLO, M. P., COASSIN, M., DI LISA, F. (1988): Modification of the xanthine-converting enzyme of perfused rat heart during ischemia and oxidative stresses. *Free Rad Biol Med* 4: 163-167.

- 13) BOLLI, R., JEROUDI, M. O., PATEL, B. S., DU BOSE, C. M., LAI, E. K., ROBERTS, R., MCCAY, P. B. (1989): Direct evidence that oxygen-derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 4695-4699.
- 14) BONGARZONE, E. R., PASQUINI, J. M., SOTO, E. F. (1995): Oxidative damage to proteins and lipids of CNS myelin produced by in vitro generated oxygen species. *J Neurosci Res* 41: 213-221.
- 15) BORCHARD, U., GREEFF, K., HAFNER, D. (1980): Quantitative Beurteilung herzwirksamer Pharmaka durch rechnergesteuerte Analyse der Ventrikeldruckkurve während der isovolumetrischen Kontraktion. *Basic Res Cardiol* 75: 378-389.
- 16) BRAUNWALD, E., KLONER, R. A. (1985): Myocardial reperfusion: A double-edged sword? *J Clin Invest* 76: 1713-1719.
- 17) BREDENSEN, D. E. (1995): Neural apoptosis. *Ann Neurol* 38: 839-851.
- 18) BRETSCHNEIDER, H. J. (1964): Überlebens- und Wiederbelegungszeit des Herzens in Normo- und Hypothermie. *Verh Dtsch Ges Kreisl Forsch* 30: 11-34.
- 19) BRETSCHNEIDER, H. J., HÜBNER, G., KNOLL, D., LOHR, B., NORDBECK, H., SPIECKERMANN, P. G. (1975): Myocardial resistance and tolerance to ischemia: Physiological and biochemical basis. *J Cardiovasc Surg* 16: 241-260.
- 20) BURTON, K., MCCORD, J., GHAI, G. (1984): Myocardial alterations due to free radical generation. *Amer J Physiol* 246: H776-H783.
- 21) CARREIRA, R. S., FACUNDO, H. T., KOWALTOWSKI, A. J. (2005): Mitochondrial K⁺ transport and cardiac protection during ischemia/reperfusion. *Braz J Med Biol Res* 38: 345-352.
- 22) CROSS, C. E. (1987): Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 107: 526-545.
- 23) DALY, M. J., ELZ, J. S., NAYLER, W. G. (1984): Sarcolemmal enzymes and Na⁺ -Ca²⁺ exchange in hypoxic, ischemic, and reperfused rat hearts. *Am J Physiol* 247: H237-43.
- 24) DAS, D. K. (2000): Redox regulation of cardiomyocyte survival and death. *Antiox Redox Signal* 3: 23-27.
- 25) DAS, D. K., ENGELMAN, R. M., ROUSOU, J. A., BREYER, R. H., OTANI, H., LEMESHOW, S. (1986): Pathophysiology of superoxide radical as potential mediator of reperfusion injury in pig heart. *Basic Res Cardiol* 81: 155-166.
- 26) DÖRING, J. M., DEHNERT, H. (1985): Das isoliert perfundierte Warmblüter-Herz nach Langendorff: Methoden der experimentellen Physiologie und Pharmakologie. Biomesstechnik-Verlag, March-Hugstetten.

- 27) DOWNEY, J. M., HEARSE, D. J., YELLON, D. M., MANNING, A. S. Xanthine oxidase as a source of free radicals in myocardial ischemia. In: STONE, H. L., WEGLICKI, W. B. (Hrsg.). Pathobiology of cardiovascular injury. Martinus Nijhoff Publishing. Boston, (1986): 334-349.
- 28) FERRARI, R., CECONI, C., CURELLO, S. (1985): Oxygen-mediated myocardial damage during ischaemia and reperfusion: Role of the cellular defenses against oxygen toxicity. *J Mol Cell Cardiol* 17: 937-945.
- 29) FINKEL, T., HOLBROOK, N. J. (2000): Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-274.
- 30) FLAHERTY, J. T., PITT, B., GRUBER, J. W., HEUSER, R. R., ROTHBAUM, D. A., BURWELL, L. R., GEORGE, B. S., KEREIAKES, D. J., DEITCHMAN, D., GUSTAFSON, N. (1994): Recombinant human superoxide dismutase (h-SOD) fails to improve recovery of ventricular function in patients undergoing coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation* 89: 1982-1991.
- 31) FLAMENG, W. (1995): New strategies for intraoperative myocardial protection. *Curr Opin Cardiol* 10: 577-583.
- 32) FLECKENSTEIN, A., DÖRING, H. J., KAMMERMEIER, H. (1967): Myokardstoffwechsel und Insuffizienz. *Ärztl Forschung* 21: 1-14.
- 33) FLECKENSTEIN, A., DÖRING, H. J., KAMMERMEIER, H. (1976): Myokardstoffwechsel und Insuffizienz. *Ärztl Forschung* 21: 1-14.
- 34) FÖRSTERMANN, U. (1991): Verminderte Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus arteriosklerotischen Koronargefäßen. *Dtsch Med Wschr* 116: 758-759.
- 35) FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 8. Aufl. München: Urban & Fischer (2001).
- 36) FOX, A. A., BERGMANN, R. R., SOBEL, B. E. (1985): Pathophysiology of myocardial reperfusion. *Ann Rev Med* 36: 125-144.
- 37) FREEMAN, B. A., WHITE, C. R., GUTIERREZ, H., PALER-MARTINEZ, A., TARPEY, M. M., RUBBO, H. (1995): Oxygen radical-nitric oxide reactions in vascular diseases. *Adv Pharmacol* 34: 45-69.
- 38) FRIDOVICH, I. (1978): The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 857-880.
- 39) FRIDOVICH, I. (1995): Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64: 97-112.
- 40) FUKUSE, T., ALBES, J. M., TAKAHASHI, Y., BRANDES, H., HAUSEN, B., SCHÄFERS, H. J. (1995): Influence of red blood cells on lung function in an ex vivo rat heart-lung model. *J Surg Res* 59: 399-404.

- 41) FURCHGOTT, R. F., ZAWADZKI, J. V. (1980): The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373.
- 42) GARLICK, P. B., DAVIES, M. J., HEARSE, D. J., SLATER, T. F. (1987): Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin spectroscopy. *Circ Res* 61: 757-760.
- 43) GERLACH, E., NEES, S., BECKER, B. F. (1985): The vascular endothelium: A survey of some newly evolving biochemical and physiological features. *Basic Res Cardiol* 80: 459-474.
- 44) GRILL, H. P., ZWEIER, J. L., KUPPUSAMY, P., WEISFELDT, M. L., FLAHERTY, J. T. (1992): Direct measurement of myocardial free radical generation in an in vivo model: Effects of post-ischemic reperfusion and treatment with human recombinant superoxide dismutase. *J Am Coll Cardiol* 20: 1604-1611.
- 45) GROSS, G. R., O'ROURKE, S. T., PELC, L. R. (1992): Myocardial and endothelial dysfunction after multiple, brief coronary occlusions: Role of oxygen radicals. *Am J Physiol* 263: H1703-H1709.
- 46) HAIDER, W. (1975): Prävention von Stresswirkungen durch metabolische Beeinflussung des Energiestoffwechsels am Modell der extrakorporalen Zirkulation. *Wien Klin Wochenschr* 87: S1-S27.
- 47) HALLIWELL, B. (1984): Oxygen radicals: A common sense look at their nature and medical importance. *Med Biol* 62: 71-77.
- 48) HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. (1990): Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol* 186: 1-85.
- 49) HARAMAKI, N., STEWART, D. B., AGGARWAL, S., IKEDA, H., REZNICK, A. Z., PACKER, K. (1998): Networking antioxidants in the isolated rat heart are selectively depleted by ischemia-reperfusion. *Free Rad Biol Med* 25: 329-339.
- 50) HAVENAAR, R., MEIJER, J. C., MORTON, D. B., RITSEKS-HOITINGA, J., ZWART, P. Biologie, Zucht und Haltung von Versuchstieren. In: VAN ZUTPHEN, L. F. M., BAUMANS, V., BEYNEN, A. C. (Hrsg.). *Grundlagen der Versuchstierkunde*. Jena. Stuttgart, (1995): 19-70.
- 51) HEARSE, D. J., CHAIN, E. B. (1972): The role of glucose in the survival and "recovery" of the anoxic isolated perfused rat heart. *Biochem J* 128: 1125-1133.
- 52) HEARSE, D. J., GARLICK, P. B., HUMPHREY, S. M. (1977): Ischemic contraction of the myocardium: Mechanisms and prevention. *Amer J Cardiol* 39: 986-993.
- 53) HEARSE, D. J., STEWART, D. A., CHAIN, E. B. (1974): Recovery from cardiac bypass and elective cardiac arrest: The metabolic consequences of various cardioplegic procedures in the isolated rat heart. *Circ Res* 35: 448-457.

- 54) HEARSE, D. J., STEWART, D. A., GREEN, D. K. (1978): Myocardial susceptibility to ischemic damage: A comparative study of disease models in the rat. *Eur J Cardiol* 6: 437-450.
- 55) HEARSE, D. J., ZUCCHI, R., BUSCHMANS, E., MANNING, A. S. (1986): Forskolin and myocardial function in the normal, ischemic and reperfused rat heart. *Can J Cardiol* 2: 303-12.
- 56) HENDERSON, A. H., MOST, A. S., PARNLEY, W. W., GORLIN, R., SONNENBLICK, E. H. (1980): Depression of myocardial contractility in rats by free fatty acids during hypoxia. *Circ Res* 26: 439-449.
- 57) HICKEY, K. A., RUBANYI, G., PAUL, R. J., HIGHSMITH, R. F. (1985): Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 248: C550-C556.
- 58) HOAK, J. C., CONNOR, W. E., ECKSTEIN, J. W., WARNER, E. D. (1964): Fatty acid induced thrombosis and death: Mechanisms and prevention. *J Lab Clin Med* 63: 791-795.
- 59) HOCKENBERY, D. M., OLTVAI, Z. N., YIN, X. M., MILLIMAN, C. L., KORSMEYER, S. J. (1993): Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75: 241-251.
- 60) HOHORST, H. J., REIM, M., BARTELS, H. (1962): Studies on the creatine kinase equilibrium in muscle and the significance of ATP and ADP levels. *Biochem Biophys Res Commun* 7: 142-151.
- 61) HUGENHOLTZ, P. G. (1988): To reperfuse or not to reperfuse, which is the question? *J Mol Cell Cardiol* 20: 367-369.
- 62) IGNARRO, L. J., BYRNS, R. E., BUGA, G. M., WOOD, K. S. (1987): Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacological and chemical properties that are identical to those for nitric oxide radical. *Circ Res* 61: 866-879.
- 63) INAUEN, W., SUZUKI, M., GRANGER, D. N. (1989): Mechanisms of cellular injury: potential sources of oxygen free radicals in ischemia/reperfusion. *Microcirc Endothelium Lymphatics* 5: 143-155.
- 64) INOUE, A., YANIGASAWA, M., KIMURA, S., KASUYA, Y., MIYAUCHI, T., GOTO, K., MASAKI, T. (1989): The human endothelin family: Three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2863-2867.
- 65) ISSELHARD, W. (1960): Das Verhalten des Energiestoffwechsels im Warmblüterherz bei künstlichem Herzstillstand. *Pflügers Arch* 271: 437-460.
- 66) ISSELHARD, W. (1965): Akuter Sauerstoffmangel und Wiederbelebung. *Dtsch Med Wschr* 90: 349-356.

- 67) ISSELHARD, W. (1988): Biochemistry: Index of the functional state of heart? Br J Anaesth 60: S23-S27.
- 68) ISSELHARD, W., MERGUET, H. (1962): Metabolite des Glycolyse-Cyclus und des Adenylsäure-Phosphokreatin-Systems im schlagenden und durchbluteten Warmblüterherzen unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Pflügers Arch 276: 211-235.
- 69) ISSELHARD, W., MERGUET, H., PALM, K. (1962): Bestimmung des Gesamtglycogens neben säurelöslichen Metaboliten in Perchlorsäure-Organhomogenaten. Z Exp Med 136: 174-182.
- 70) ISSELHARD, W., POHL, W., BERGHOFF, W. J. W., SCHMERBAUCH, D., SCHÜLER, H. W. (1964): Versuche zur Verbesserung der Energiebereitstellung im künstlich stillgelegten Herzen und in der Erholung bei Reperfusion. Verh Dtsch Ges Kreisl Forsch 30: 216-221.
- 71) JACOB, R., WEIGAND, K. H. (1966): Die enddiastolische Druck-Volumen-Beziehungen als Grundlage einer Beurteilung der Kontraktilität des linken Ventrikels in situ. Pflügers Arch 289: 37-49.
- 72) JACOBSEN, M. D. (1996): Reactive oxygen species and programmed cell death. TIBS 21: 83-86.
- 73) JAESCHKE, H. (1995): Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. Soc Exp Biol Med 209: 104-111.
- 74) JANSE, M. J., WILMS-SCHOPMAN, F. (1982): Effect of changes in perfusion pressure on the position of the electrophysiologic border zone in acute regional ischemia in isolated perfused dog and pig hearts. Am J Cardiol 50: 74-82.
- 75) JESBERGER, J. A., RICHARDSON, J. S. (1991): Oxygen free radicals and brain dysfunction. Intern J Neurosci 51: 1-17.
- 76) JOLLY, S. R., KANE, W. J., BAILIE, M. B., ABRAMS, C. D., LUCCHESI, B. R. (1984): Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. Circ Res 54: 277-285.
- 77) JURMANN, M. J., SCHAEFERS, H. J., DAMMENHEIM, L. (1988): Oxygen-derived free radical scavengers amelioration of reperfusion damage in heart transplantation. J Thorac Cardiovasc Surg 95: 368-377.
- 78) KANG, Y. J. (1999): The antioxidant function of metallothionein in the heart. Proc Soc Exp Biol Med 222: 263-273.
- 79) KARLSSON, K., MARKLUND, S. L. (1988): Extracellular superoxide dismutase in the vascular system of mammals. Biochem J 255: 223-228.
- 80) KELM, M., FEELISCH, M., DEUSSEN, A., STRAUER, B. E., SCHRADER, J. (1991): Release of endothelium derived nitric oxide in relation to pressure and flow. Cardiovasc Res 25: 831-836.

- 81) KLEIN, H. H., SPAAR, U., SCHLEPPLE, H. (1986): Comparative analysis of myocardial enzyme activities of the energy-supplying metabolism in patients with dilatative cardiomyopathies and valve diseases. *Clin Cardiol* 9: 197-202.
- 82) KLONER, R. A. (1993): Does reperfusion injury exist in humans? *J Am Coll Cardiol* 21: 537-545.
- 83) KRAUSE, G. S., KUMAR, K., WHITE, B. C., AUST, S. D., WIEGENSTEIN, J. G. (1986): Ischemia, resuscitation, and reperfusion: mechanisms of tissue injury and prospects for protection. *Am Heart J* 111: 768-780.
- 84) KREBS, H. A., HENSELEIT, K. (1932): Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe-Seylers Zschr Physiol Chem* 210: 33-66.
- 85) KU, D. D. (1982): Coronary vascular reactivity after myocardial ischemia. *Science* 218: 576-578.
- 86) KÜBLER, W., SPIECKERMANN, P. G. (1970): Regulation of glycolysis in the ischemic and the anoxic myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1: 351-377.
- 87) KURIEN, V. A., YATES, P. A., OLIVER, M. F. (1971): The role of free fatty acids in the production of ventricular arrhythmias after acute coronary artery occlusion. *Eur J Clin Invest* 1: 225-241.
- 88) KUROSE, I., GRANGER, D. N. (1994): Evidence implicating xanthine oxidase and neutrophils in reperfusion-induced microvascular dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* 723: 158-179.
- 89) LAUDE, K., THUILLEZ, C., RICHARD, V. (2001): Coronary endothelial dysfunction after ischemia and reperfusion: A new therapeutic target? *Braz J Med Biol Res* 34: 1-7.
- 90) LEVITSKY, S., FEINBERG, H. (1975): Biochemical changes of ischemia. *Ann Thorac Surg* 20: 21-29.
- 91) LIEDTKE, A. J., NELLIS, S. H., NEELY, J. R. (1978): Effects of excess free fatty acids on mechanical and metabolic function in normal and ischemic myocardium in swine. *Circ Res* 43: 652-661.
- 92) LÖFFLER, G., PETRIDIS, P. E. *Biochemie und Pathobiochemie*. 7. Aufl. Berlin: Springer (2003).
- 93) MANNING, A. S., COLTART, D. J., HEARSE, D. J. (1984): Ischemia and reperfusion-induced arrhythmias in the rat. Effects of xanthine-oxidase inhibition with allipurinol. *Circ Res* 55: 545-548.
- 94) MANTLE, J. A., ROGERS, W. J., SMITH, L. R., MCDANIEL, H. G., PAPAPIETRO, S. E., RUSSELL, R. O., RACKLEY, C. R. (1981): Clinical effects of glucose insulin potassium on left ventricular function and acute myocardial infarction: Results from a randomized clinical trial. *Am Heart J* 102: 313-324.

- 95) MARBER, M. S., WALKER, D. M., EVESON, D. J., WALKER, J. M., YELLON, D. M. (1993): A single five minute period of rapid atrial pacing fails to limit infarct size in the in situ rabbit heart. *Cardiovasc Res* 27: 597-601.
- 96) MARCZIN, N., EL-HABASHI, N., HOARE, G. S., BUNDY, R. E., YACOUB, M. (2003): Antioxidants in myocardial ischemia-reperfusion injury: Therapeutic potential and basic mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 420: 222-236.
- 97) MASON, D. T. (1969): Usefulness and limitations of the rate of rise of intraventricular pressure (dp/dt) in the evaluation of myocardial contractility in man. *Amer J Cardiol* 23: 516-527.
- 98) MCCORD, J. M. (1988): Free radicals and myocardial ischemia: Overview and outlook. *Free Rad Biol Med* 4: 9-14.
- 99) MCFALLS, E. O., LIEM, D., SCHOONDERWOERD, K., LAMERS, J., SLUITER, W., DUNCKER, D. (2003): Mitochondrial function: the heart of myocardial preservation. *J Lab Clin Med* 142: 141-148.
- 100) MEHTA, J. L., NICHOLS, W. W., DONNELLY, W. H., LAWSON, D. L., SALDEEN, T. G. (1989a): Impaired canine coronary vasodilator response to acetylcholine and bradykinine after occlusion-reperfusion. *Circ Res* 64: 43-54.
- 101) MEHTA, J. L., NICHOLS, W. W., DONNELLY, W. H., LAWSON, D. L., THOMPSON, L., TER RIERT, M., SALDEEN, T. G. (1989b): Protection by superoxide dismutase from myocardial dysfunction and attenuation of vasodilator reserve after coronary occlusion and reperfusion in dog. *Circ Res* 65: 1283-1295.
- 102) MENASCHE, P. (1997): New strategies in myocardial preservation. *Curr Opin Cardiol* 12: 504-514.
- 103) MOIR, T. W., DRISCOL, T. E., ECKSTEIN, R. W. (1964): Thebesian drainage in the left heart of dog. *Circ Res* 14: 244-249.
- 104) MORGENSTERN, C., ARNOLD, G., HÖLJES, U., LOCHNER, W. (1970): Die Druckanstiegsgeschwindigkeit im linken Ventrikel als Maß für die Kontraktilität unter verschiedenen hämodynamischen Bedingungen. *Pflügers Arch* 315: 173-186.
- 105) MORGENSTERN, C., GOEBEL, H., LOCHNER, W. (1972): Die Beurteilung der Kontraktilität des Herzens. *Dtsch Med Wschr* 97: 1563-1568.
- 106) MÜGGE, A., FÖRSTERMANN, U., LICHTLEN, P. R. (1989): Endothelial-Funktionen bei kardiovaskulären Erkrankungen. *Z Kardiol* 78: 147-160.
- 107) MULDER, P., RICHARD, V., DERUMEAUX, G., HOGIE, M., HENRY, J. P., LALLEMAND, F., COMPAGNON, P., MACE, B., COMOY, E., LETAC, B., THUILLET, C. (1997): Role of endogenous endothelin in chronic heart failure: Effect of long-term treatment with an endothelin antagonist on survival, hemodynamics, and cardiac remodeling. *Circulation* 96: 1976-1982.

- 108) MUZYKANTOV, V. R. (2001): Targeting of superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium. *J Controlled Release* 71: 1-21.
- 109) NAGEL, S. (1970): Die Beurteilung von Kreatinphosphat und Adenosintriphosphat in Hinblick auf die Energiebereitstellung, -transport und -verwertung im normalen und insuffizienten Herzmuskel. *Klin Wschr* 48: 332-341.
- 110) NEELY, J. R., LIEBERMEISTER, H., BATTERSBY, E. J., MORGAN, H. E. (1967): Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart. *Amer J Physiol* 212: 804-814.
- 111) OLIVER, M. F. (1972): Metabolic response during impending myocardial infarction. II: Clinical implications. *Circulation* 45: 491-500.
- 112) OMAR, B. A., GAD, N. M., JORDAN, M. C., STRIPLIN, S. P., RUSSELL, W. J., DOWNEY, J. M., MCCORD, J. M. (1990): Cardioprotection by Cu, Zn-superoxide dismutase is lost at high doses in the reoxygenated heart. *Free Rad Biol Med* 9: 465-471.
- 113) OPIE, L. H. (1972): Metabolic response during impending myocardial infarction. I. Relevance of studies of glucose and fatty acid metabolism. *Circulation* 45: 483-490.
- 114) OTANI, H., ENGELMAN, R. M., ROUSOU, J. A., BREYER, R. H., LEMESHOW, S., DAS, D. K. (1986): Cardiac performance during reperfusion improved by pretreatment with oxygen free radical scavengers. *J Thorac Cardiovasc Surg* 91: 290-295.
- 115) PALMER, R. M. J., FERRIGE, A. G., MONCADA, S. (1987): Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526.
- 116) PETTY, M. A., LUKOVIC, L., GRISAR, J. M., DOW, J., BOLKENIUS, F. N., DE JONG, W. (1994): Myocardial protection by a cardioselective free radical scavenger. *Eur J Pharmacol* 255: 215-222.
- 117) PHILLIS, J. W. (1994): A "radical" review of cerebral ischemic injury. *Progr Neurobiol* 42: 441-448.
- 118) PILZ, R. B., CASTEEL, D. E. (2003): Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circ Res* 93: 1034-1046.
- 119) PIPER, H. M., VOLZ, A., SCHWARTZ, P. Adult ventricular rat heart muscle cells. *Tissue and culture techniques in heart and vessel research*. Berlin-Heidelberg: H. M. Piper (1992).
- 120) PRASAD, K., KALRA, J., BHARADWAJ, L. (1993): Cardiac depressant effects of oxygen free radicals. *Angiology* 44: 257-270.
- 121) REEVES, T. J., HEFNER, L. L. (1962): Isometric contraction and contractility in the intact mammalian ventricle. *Am Heart J* 64: 525-538.

- 122) REIDY, M. A., CLOWES, A. W., SCHWARTZ, S. M. (1983): Endothelial regeneration: Inhibition of endothelial regrowth in arteries of rat and rabbit. *Lab Invest* 49: 569-575.
- 123) ROBINSON, L. A., BRAIMBRIDGE, M. V., HEARSE, D. J. (1983): Particulate contamination: A potential hazard of cardioplegia. *Lancet* 8331: 995-996.
- 124) ROBINSON, L. A., BRAIMBRIDGE, M. V., HEARSE, D. J. (1984): The potential hazard of particulate contamination of cardioplegic solution. *J Thorac Cardiovasc Surg* 87: 48-58.
- 125) ROGERS, W. J., RUSSELL, R. O., MCDANIEL, H. G., RACKLEY, C. R. (1977): Effects of glucose-insulin-potassium infusion on myocardial metabolism in man. *Am J Cardiol* 40: 421-428.
- 126) ROSEN, G. M., FREEMAN, B. A. (1984): Detection of superoxide generated by endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 7269-7273.
- 127) ROSENKRANZ, E. R., OKAMOTO, F., BUCKBERG, G. D., VINTEN-JOHANSEN, J., ALLEN, B. S., LEAF, J., BUGYI, H., YOUNG, H., BARNARD, J. (1986): Studies on controlled reperfusion after ischemia. II. Biochemical studies: Failure of tissue adenosine triphosphate levels to predict recovery of contractile function after controlled reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 92: 488-501.
- 128) RUBANYI, G. (1988): Vascular effects of oxygen-derived free radicals. *Free Rad Biol Med* 4: 107-120.
- 129) RUBANYI, G., KOVACH, G. (1980): The role of coronary perfusion pressure in the control of mechanical performance and O₂-consumption in the isolated rat heart. *Acta Physiol Acad Sci Hung* 55 .
- 130) RUTISHAUSER, W., KRAYENBÜHL, H. P. Faktoren zur Beurteilung der Kontraktilität. . In: RUTISHAUSER, W., KRAYENBÜHL, H. P. (Hrsg.). *Herzinsuffizienz. Pathophysiologie und Klinik*. Thieme. Stuttgart, (1968): 476-479.
- 131) SCHOCKHOVEN, S. (1992): Perfusionsdruckabhängige und -gesteuerte postischämische Erholung von Stoffwechsel und Funktion normaler und hypertrophierter Rattenherzen. *Diss. med. vet., Gießen*.
- 132) SCHRÖR, K. (1985): Prostaglandins, other eicosanoids and endothelial cells. *Basic Res Cardiol* 80: 502-514.
- 133) SCHULTHEISS, H. P. (1992): Dysfunction of the ADP/ATP carrier as a causative factor for the disturbance of the myocardial energy metabolism in dilated cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 87: 311-320.
- 134) SCHULZ, E., ANTER, E., KEANEY, J. F., JR. (2004): Oxidative stress, antioxidants, and endothelial function. *Curr Med Chem* 11: 1093-1104.
- 135) SCHWARTZ, S. M., BENDITT, E. P. (1973): Cell replication in the aortic endothelium: A new method for study of the problem. *Lab Invest* 28 : 699-707.

- 136) SEVEREID, L., CONNOR, W. E., LONG, J. P. (1969): The depressant effect of fatty acids on the isolated rabbit heart. *Proc Soc Exp Biol Med* 131: 1239-1244.
- 137) STEIN, T. (1993): Erholung normaler und Druck-hypertrophierter Herzen nach hypothermer Kalium-Kardioplegie und globaler Ischämie bei verschiedenen Perfusionsdrücken bzw. unterschiedlich schneller Steigerung des Reperfusionssdruckes. *Diss. med., Köln*.
- 138) STOHS, S. J., BAGCHI, D. (1995): Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Rad Biol Med* 18: 321-336.
- 139) STRAUER, B. E. (1973): Kriterien zur Beurteilung der Myokardkontraktilität am hypertrophen und insuffizienten Herzen. *Klin Wschr* 51: 307-321.
- 140) TAEGTMEYER, H. (1994): Energy metabolism of the heart: From basic concepts to clinical applications. *Curr Probl Cardiol* 19: 59-68.
- 141) TANGUAY, M., JASMIN, G., BLAISE, G., DUMONT, L. (1995): Resistance of the failing dystrophic hamster heart to the cardioprotective effects of diltiazem and clentiazem: evidence of coronary vascular dysfunctions. *Can J Physiol Pharmacol* 73: 1108-17.
- 142) THOM, W., PFLEIDERER, G., FROHWEIN, R. A., ROSS, J. (1955): Stoffwechselvorgänge im Gehirn bei akuter Anoxie, akuter Ischämie und in der Erholung. *Pflügers Arch* 261: 334-357.
- 143) TONNESSEN, T., CHRISTENSEN, G., OIE, E., KJEKTUS, H., SMISETH, O. A., SEJERSTED, O. M., ATTRAMADAL, H. (1997): Increased cardiac expression of endothelin-1 mRNA in ischemic heart failure in rats. *Cardiovasc Res* 33: 601-610.
- 144) TSAO, P. S., AOKI, N., LEFER, D. J., JOHNSON, G., LEFER, A. M. (1990): Time course of endothelium dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the cat. *Circulation* 82: 1402-1412.
- 145) TSAO, P. S., MA, X. L., LEFER, A. M. (1992): Activated neutrophils aggravate endothelial dysfunction after reperfusion of the ischemic feline myocardium. *Am Heart J* 123: 1464-71.
- 146) VAN BENTHUYSEN, K. M., MCMURTRY, I. F., HORWITZ, L. D. (1987): Reperfusion after acute coronary occlusion in dogs impairs endothelium-dependent relaxation to acetylcholine and augments contractile reactivity in vitro. *J Clin Invest* 79: 265-274.
- 147) WARBURG, O., NEGELEIN, E. (1929): Über das Absorptionsspektrum des Atmungsferments. *Biochem Z* 214: 64-84.
- 148) WARD, P. A. (1991): Mechanisms of endothelial cell killing by H₂O₂ or products of activated neutrophils. *Am J Med* 91: 89S-94S.

- 149) WATANABE, B. I., LIMM, W., SUEHIRO, A., SUEHIRO, G., PREMARATNE, S., MCNAMARA, J. J. (1993): Failure of deferoxamine to reduce myocardial infarct size in a primate model of ischemia - reperfusion injury. *J Surg Res* 55: 537-542.
- 150) WEISFELDT, M. L., SMELLY, H. E., FREDERIKSEN, J., RUBENSTEIN, J. J., PROHOST, G. M., BEIERHOLM, E., BELLO, A. G., DAGGELT, W. M. (1974): Hemodynamic determinants of maximum negative dp/dt and periods of diastole. *Amer J Physiol* 227: 613-621.
- 151) WERNS, S. W., LUCCHESI, B. R. (1988): Leucocytes, oxygen radicals and myocardial injury due to ischemia and reperfusion. *Free Rad Biol Med* 4: 31-37.
- 152) WERNS, S. W., SHEA, M. J., DRISCOLL, E. M., COHEN, C., ABRAMS, C. D., PITT, B., LUCCHESI, B. (1985): The independent effects of oxygen radical scavengers on canine infarct size. Reduction by superoxide dismutase but not catalase. *Circ Res* 56: 895-898.
- 153) WILSON, R. F., WHITE, C. W. (1986): Intracoronary papaverine: An ideal coronary vasodilator for studies of the coronary circulation in conscious humans. *Circulation* 73: 444-451.
- 154) WINGENFELD, P. (1993): Untersuchungen über die Auswirkungen von hochdosierten Adenosininfusionen auf Stoffwechselstatus, Funktion und Hypoxietoleranz des isoliert perfundierten Rattenherzens. Diss. med., Köln.
- 155) WOLLENBERGER, A., RISTAU, O., SCHOFFA, G. (1960): Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung größerer Gewebestücke. *Pflügers Arch* 270: 399-412.
- 156) WOLLENBERGER, A., RISTAU, O., SCHOFFA, G. (1980): Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung größerer Gewebestücke. *Pflügers Arch* 270: 399-412.
- 157) YANIGASAWA, M., KURIHARA, H., KIMURA, S., TOMOBE, Y., KOBAYASHI, M., MITSUI, Y., YAZAKI, Y., GOTO, K., MASAKI, T. (1988): A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-415.
- 158) YOSHIDA, T., MAULIK, N., ENGELMAN, R. M., HO, Y. S., DAS, D. K. (2000): Targeted disruption of the mouse SOD 1 gene makes the heart vulnerable to ischemic reperfusion injury. *Circ Res* 86: 264-269.
- 159) ZIJLSTRA, F., REIBER, J. H. C., SERRUYS, P. W. (1988): Does intracoronary papaverine dilate epicardial coronary arteries? *Catheterization and Cardiovascular Diagnosis* 14: 1-6.
- 160) ZWEIER, J. L., KUPPUSAMY, P., THOMPSON-GORMAN, S., KLUNK, D., LUTTY, G. A. (1994): Measurement and characterization of free radical generation on reoxygenated human endothelial cells. *Amer J Physiol* 266: C700-C708.

9 Verzeichnis der Abkürzungen

ACh	Acetylcholin
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CaCl ₂	Calcium-Chlorid
Ca-EDTA	Calcium-Ethylendiaminetetraacetat
cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
CGMP	Cyclisches Guanosin-Monophosphat
+dp/dtmax	Druckanstiegs-Geschwindigkeit
-dp/dtmax	Druckabfall-Geschwindigkeit
ECP	energy charge potential
EDRF	Endothel Derived Relaxing Factor
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
FG	Feuchtgewicht
FKr	Freies Kreatin
GKr	Gesamtkreatin
H ₂ O ₂	Hydrogenperoxyd
KCl	Kalium-Chlorid
KH	Krebs-Henseleit
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
LVD	linksventrikuläre Druck
MgCl ₂	Magnesium-Chlorid
MgSO ₄	Magnesium-Sulfat
NaCl	Natrium-Chlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NO	Stickstoffmonoxid
OH	Hydroxyl-Radikal
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff
PAF	Platelet Activating Factor
PAP	Papaverin
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PGI ₂	Prostacyclin

Verzeichnis der Abkürzungen

PKr	Phosphokreatin
s	Standardabweichung, standard deviation
SAN	Summe der Adeninnukleotide
SEM	Mittlere Fehler des Mittelwertes, standard error of means
SOD	Superoxid–Dismutase
TG	Trockengewicht
VG	Ventrikelgewicht
\bar{x}	Mittelwert

10 Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich für die zahlreiche Hilfe und Unterstützung bei der Realisierung meiner Doktorarbeit bedanken.

An erster Stelle einen großen Dank an Herrn Professor Dr. Isselhard, meinen Doktorvater. Er hat mir immer mit großer Geduld und wertvollen Ratschlägen zur Seite gestanden. Zahlreiche fachliche Diskussionen und Anregungen trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei. Unsere Zusammenarbeit wurde in tiefer Trauer beendet. Professor Dr. Isselhard verstarb an einer anhaltenden Herzerkrankung.

Zu großem Dank bin ich Herrn Professor Dr. Thomas Minor verpflichtet, der es mir ermöglicht hat, die Arbeit nach dem Tod von Professor Isselhard zum Abschluss zu bringen.

Danken möchte ich Herrn Professor Dr. Klaus H. Bonath, der sich trotz seiner wenigen kostbaren Zeit bereit erklärt, die Betreuung meiner Arbeit zu übernehmen.

Ein großes Dankeschön an Herrn Professor Dr. J. Sturz. Viele Tage half er mir beim Tierexperiment mit geschicktem Handling und guter aufmunternder Laune, ohne sich vor Schwierigkeiten zu scheuen. Danke auch an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Institutes für experimentelle Medizin für ihre Hilfe, die rund um die Versuche von Nöten war. Die Zusammenarbeit mit ihnen war ein Meilenstein bei der Erstellung meiner Doktorarbeit. Sie gaben mir alle durch ihr beträchtliches Fachwissen, ihre konstruktiven Kritiken und ihre zahlreichen Ideen immer wieder die nötige Motivation für meine wissenschaftliche Arbeit.

Besonderen Dank an meine großartige Mutter. Sie hat mich nicht nur in finanzieller Hinsicht unterstützt, sondern mir durch ihre liebevolle Betreuung meiner Kinder einen großen Freiraum für meine Arbeit verschafft. Sie ist trauriger Weise im letzten Jahr an einer schweren Erkrankung gestorben.

Danke an meinen Mann und meine Kinder. Ihnen ein großes Lob für ihre unendliche Geduld und Aufmunterung in schwierigen Zeiten, für ihre liebevolle und humorvolle Art, mit der sie mich während dieser Zeit im Alltag über eine lange Zeit ertragen haben.

In tiefer Dankbarkeit möchte ich diese Dissertation meinem Mann, meinen vier Kindern und meiner Mutter widmen.

Zum Schluss sei meinen Freunden und Bekannten gedankt, die mich tatkräftig unterstützt haben, mich – wenn nötig – stets wieder aufbauten und für die erforderliche Abwechslung in dieser aufregenden Zeit sorgten.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5388-5

